



**Universidad Michoacana De San Nicolás
De Hidalgo**



Facultad De Químico Farmacobiología

Ecología microbiana del tracto digestivo del escarabajo
barrenador *Oncideres albomarginata chamela*:
interacciones mediadas por Actinobacterias

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE

Química Farmacobióloga

PRESENTA

Indira Medina Reséndiz

ASESORA

Doctora en Ciencias Biológicas Nancy Calderón Cortés

Agradecimientos institucionales

Investigación realizada con financiamiento del proyecto DGAPA-PAPIIT-UNAM IN217420 "Adaptaciones moleculares y microbiota involucrada en la manipulación física y bioquímica de madera por un insecto barrenador ingeniero del ecosistema" otorgados a la Dra. Nancy Calderón.

Agradezco al Programa DGAPA-PAPIIT-UNAM por la beca de titulación (283721) recibida para el desarrollo del presente proyecto de tesis.

Agradezco al Dr. Jesús Llanderal Mendoza por el apoyo técnico para el desarrollo de las técnicas moleculares, a la Sra. Claudia Brenes por el apoyo logístico recibido para la realización del presente proyecto y a la Estación de Biología Chamela de la UNAM por el apoyo para realizar la colecta de las muestras de insectos.

Agradezco a los miembros del comité de revisores Dr. Carlos Cortés Penagos, EBC Virginia Campos Cabrera, M.C. Rosa Elena Torrez Ruiz, M.C. Eréndira Solache Huacuz y al Dr. Horacio Cano Camacho por formar parte importante del presente documento.

En especial, agradezco a mi asesora la Dra. Nancy Calderón por la confianza de recibirme en su laboratorio y otorgarme la oportunidad de aportar a mi manera a su valioso proyecto.

En cierto sentido la patogenicidad es una especie de accidente biológico, un oficio altamente calificado que sólo una pequeñísima minoría de todas las incontables toneladas de microbios de la Tierra se ha involucrado en la misma.

La mayoría de las bacterias están ocupadas con sus propios asuntos, curioseando y reciclando los restos de la vida.

Lewis Thomas, La medusa y el caracol

Resumen

Parte del éxito evolutivo de los insectos se debe a la microbiota que reside en su tracto digestivo, ya que se ha encontrado que esta asociación es importante tanto para el bienestar del anfitrión como para el de los microorganismos, particularmente para los xilófagos que prosperan consumiendo alimentos pobres en nutrientes, para los cuales la provisión de nutrientes se ha propuesto como el papel principal de la mayoría de los microorganismos en su microbioma. Sin embargo, se sabe poco sobre las interacciones entre los miembros de esta comunidad microbiana y las funciones clave que pueden proporcionar a sus insectos anfitriones. Por lo tanto, en este estudio evaluamos qué tipo de interacción (a través del continuo competencia-mutualismo) existe entre cuatro cepas de actinobacterias del tracto digestivo de *Oncideres albomarginata chamela* (Cerambycidae), aisladas e identificadas por métodos moleculares utilizando marcadores universales, y dos géneros de hongos miembros del mismo microbioma del insecto. Nuestros resultados indican que las actinobacterias aisladas *Brachybacterium* sp., *Pseudoarthrobacter* sp. y *Arthrobacter* sp. parecen estar involucradas en una interacción neutral con cada uno de los géneros fúngicos probados, pero la actinobacteria *Streptomyces* sp. mantuvo una interacción competitiva (revelada por inhibición del crecimiento) contra los hongos *Stagonospora* sp. y *Penicillium* sp. Por lo cual evaluamos el efecto antagonista del aislado de *Streptomyces* sp. sobre dos cepas comerciales de hongos entomopatógenos: *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Los resultados revelaron una inhibición significativa en el crecimiento de los dos entomopatógenos. En general, los resultados sugieren que *Streptomyces* sp. desempeña un papel clave en la estructura del microbioma del intestino de *O. albomarginata chamela* y probablemente un papel protector contra los patógenos.

Palabras clave: microbioma, simbiosis, entomopatógeno, inhibición fúngica, *Streptomyces* sp.

Abstract

Part of insect's evolutionary success is due to the microbiota residing their digestive tracts, since this association has been found to be beneficial to both host's and microbe's fitness, particularly for xylophagous insects that thrive on nutrient poor food-sources, for which nutrient provision have been proposed as the main role for most microorganisms in their microbiome. However, little is known about the interactions among the members of this microbial community and the key functions they may provide to their insect hosts. Therefore, in this study we assessed which kind of interaction (across the competition-mutualism continuum) exist between four actinobacteria strains, isolated and identified by molecular methods using universal markers from the digestive tract of *Oncideres albomarginata chamela* (Cerambycidae), and two fungal genera which are members of the same insect microbiome. Our results imply that the actinobacteria isolates *Brachybacterium* sp., *Pseudoarthrobacter* sp., and *Arthrobacter* sp. seemed to be involved in a neutral interaction with each of the tested fungal genera, but the actinobacteria *Streptomyces* sp. held a strong competitive interaction against the fungal symbionts *Stagonospora* sp. and *Penicillium* sp. (revealed by growth inhibition). Additionally, we tested the antagonistic effect of the *Streptomyces* sp. isolate over two commercial strains of the entomopathogenic fungi: *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, and these results unveiled a significant competition interaction with these fungi at different level. Overall, the results suggest that *Streptomyces* sp. plays a key role in structuring the microbiome of *O. albomarginata*'s gut and likely a protective role against pathogens.

Keywords: microbiome, symbiosis, entomopathogen, fungal inhibition, *Streptomyces* sp.

Contenido

I. Introducción	11
II. Hipótesis	13
III. Objetivos	13
General	13
Específicos	13
IV. Marco teórico	14
Microbiota intestinal de insectos	14
a) Importancia	14
b) Funciones	14
Nutrición	14
Protección contra depredadores y patógenos	15
Detoxificación de nutrientes	16
Ecología microbiana	17
a) Importancia	17
b) Interacciones microbianas	17
Diversidad de los microbiomas intestinales de insectos	19
a) Bacteriana	19
Proteobacteria	19
Firmicutes	22
Bacteroidetes	23
Actinobacteria	23
b) Fúngica	24
Insectos barrenadores	27
a) Aspectos generales	27
b) Microbiota intestinal de los insectos barrenadores	28
Aplicaciones del estudio de la microbiota intestinal de insectos	31
V. Estrategia experimental	33
Aislamiento de microorganismos	33
a) Obtención de organismos y sitio de estudio	33
b) Obtención de excretas y disección del intestino	34
c) Inoculación de extractos	35

d) Caracterización morfológica _____	35
Identificación de los aislados microbianos _____	36
a) Extracción de ADN bacteriano _____	36
b) Evaluación del ADN _____	37
c) Amplificación de ADN _____	38
d) Limpieza de productos de PCR _____	39
e) PCR de secuenciación _____	39
f) Purificación de productos de PCR de secuenciación _____	39
g) Secuenciación de Sanger por electroforesis capilar _____	39
h) Edición de secuencias _____	39
i) Análisis bioinformático _____	40
Ensayos in vitro de interacciones microbianas: inhibición fúngica mediada por actinobacterias _____	41
a) De los hongos simbiontes _____	41
b) De los hongos entomopatógenos _____	41
VI. Resultados _____	43
Aislamiento de microorganismos _____	43
Identificación molecular de los aislados bacterianos _____	45
Ensayos in vitro de interacciones microbianas: inhibición fúngica mediada por actinobacterias _____	51
a) De los hongos simbiontes _____	51
<i>Penicillium</i> sp. _____	51
<i>Stagonospora</i> sp. _____	53
b) De los hongos entomopatógenos _____	57
<i>Beauveria bassiana</i> _____	57
<i>Metarhizium anisopliae</i> _____	60
VII. Discusión _____	64
VIII. Conclusiones _____	68
IX. Perspectivas _____	69
X. Bibliografía _____	70

Índice de figuras

Figura 1: Clasificación de las interacciones ecológicas establecidas entre miembros de dos especies	18
Figura 2: Huevo de la avispa <i>Trichogramma kaykai</i>	21
Figura 3: Microscopía electrónica de <i>Pseudomonas entomophila</i>	21
Figura 4: Morfologías de cristales y esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
Figura 5: Microfotografía electrónica de barrido de <i>Streptomyces parvulus</i>	24
Figura 6: Ciclo de vida de un insecto barrenador.....	27
Figura 7: Estrategias de manejo de plagas basadas en simbioses de insectos.	31
Figura 8: Localización de la Estación de Biología Chamela	33
Figura 9: Estadios del ciclo de vida del escarabajo barrenador <i>Oncideres albomarginata chamela</i>	34
Figura 10: Esquema generalizado del sistema digestivo de insectos.....	35
Figura 11: Protocolo de extracción de ADN bacteriano	36
Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa	37
Figura 13: Preparación de muestras y estándares para cuantificar ADN	38
Figura 14: Esquema de ensayos de interacciones microbianas entre simbioses.....	41
Figura 15: Esquema de los ensayos realizados del crecimiento de los hongos frente a las actinobacterias.	42
Figura 16: Análisis electroforético del ADN purificado de los aislados bacterianos Gram positivos filamentosos o cocobacilares obtenidos del tracto digestivo de <i>Oncideres albomarginata chamela</i>	45
Figura 17: Análisis electroforético de los productos de la reacción de amplificación de un fragmento del gen ribosomal 16S de los aislados bacterianos Gram positivos filamentosos o cocobacilares obtenidos del tracto digestivo de <i>Oncideres albomarginata chamela</i>	46

Figura 18: Análisis electroforético de la limpieza de la reacción de amplificación de un fragmento del gen ribosomal 16S de los aislados bacterianos Gram positivos filamentosos o cocobacilares obtenidos del tracto digestivo de <i>Oncideres albomarginata chamela</i>	47
Figura 19: Árbol filogenético de los aislados bacterianos obtenidos de <i>Oncideres albomarginata chamela</i>	49
Figura 20: Morfología macro y microscópica del aislado bacteriano obtenido del tracto digestivo de <i>Oncideres albomarginata chamela</i> identificado genéticamente como <i>Streptomyces</i> sp.	50
Figura 21: Crecimiento de actinobacterias a los 7 días de incubación	51
Figura 22: Ensayo de crecimiento del hongo <i>Penicillium</i> sp. frente a las actinobacterias a los 7 días de incubación	52
Figura 23: Ensayo de crecimiento del hongo <i>Penicillium</i> sp. frente a las actinobacterias a los 15 días de incubación.....	52
Figura 24: Ensayo de crecimiento del hongo <i>Stagonospora</i> sp. frente a las actinobacterias a los 7 días de incubación	53
Figura 25: Ensayo de crecimiento del hongo <i>Stagonospora</i> sp. frente a las actinobacterias a los 15 días de incubación.....	54
Figura 26: Ensayo de crecimiento del hongo <i>Stagonospora</i> sp. frente a las actinobacterias a los 21 días de incubación.....	54
Figura 27: Inhibición mostrada por los hongos simbioses frente a <i>Streptomyces</i> sp.	56
Figura 28: Crecimiento de <i>Streptomyces</i> sp. a los 7 días de incubación en diferentes medios	57
Figura 29: Ensayo de crecimiento del hongo <i>Beauveria bassiana</i> frente a <i>Streptomyces</i> sp.....	58
Figura 30: Inhibición mostrada por el hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> frente a <i>Streptomyces</i> sp.....	60
Figura 31: Ensayo de crecimiento del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> frente a <i>Streptomyces</i> sp.....	61

Figura 32: Inhibición mostrada por el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* frente a *Streptomyces* sp.63

Índice de tablas

Tabla 1: Diversidad de especies bacterianas predominantes entre distintos grupos de insectos.....	20
Tabla 2: Microbiota intestinal bacteriana reportada para insectos barrenadores	29
Tabla 3: Microbiota intestinal fúngica reportada para insectos barrenadores.	30
Tabla 4: Morfología colonial de los aislados extraídos del tracto digestivo y de las excretas de <i>Oncideres albomarginata chamela</i>	41
Tabla 5: Morfología microscópica de los aislados bacterianos de textura identificada como dura	44
Tabla 6: Valores de absorbancia y concentración de ADN obtenidos mediante fluorometría	46
Tabla 7: Clasificación taxonómica asignada por BLAST NCBI de las secuencias obtenidas	48
Tabla 8: Resultados de la asignación taxonómica realizada en la base de datos SILVA.....	48
Tabla 9: Crecimiento de los hongos simbioses frente a las actinobacterias	55
Tabla 10: Crecimiento del hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> frente a <i>Streptomyces</i> sp.....	59
Tabla 11: Crecimiento del hongo entomopatógeno <i>Metarhizium anisopliae</i> frente a <i>Streptomyces</i> sp.....	62

I. Introducción

Los insectos son el grupo de animales más diverso del mundo, no sólo por la cantidad de miembros, que comprenden más de 1 millón de especies descritas y entre 4-6 millones de especies que se creen que existen (González-Tokman et al., 2018) sino porque que también representan el grupo con la gama más amplia de alimentos (Vanbergen et al., 2014). Parte de su éxito evolutivo se debe a la microbiota de su tracto digestivo con la cual los insectos establecen interacciones benéficas (Yun et al., 2014), tales como ayudar en la digestión de componentes alimenticios recalcitrantes; proteger de depredadores y parásitos e intervenir en la detoxificación de compuestos (Engel & Moran, 2013).

Las contribuciones microbianas a la nutrición del anfitrión son particularmente importantes en insectos que se alimentan de la madera: los xilófagos (Mason et al., 2017). Los insectos xilófagos se enfrentan a una dieta desafiante, ya que la corteza y la madera son nutricionalmente pobres a pesar de contener carbohidratos (celulosa y hemicelulosa), lignina (moléculas C_6-C_3 polimerizadas) y extractos como fenoles simples y ácidos fenólicos (Grünwald et al., 2010). Sin embargo, en colaboración con sus comunidades microbianas intestinales, los insectos xilófagos tienen la capacidad de producir enzimas que facilitan la degradación de material lignocelulósico (Scully et al., 2013). Dentro de los diversos grupos de insectos xilófagos se encuentran los insectos barrenadores. Éstos se desarrollan (por lo menos durante alguna parte de su ciclo de vida) en la madera, corteza o tallos leñosos de plantas (Calderón-Cortés et al., 2011). Análisis metagenómicos han revelado que los filos predominantes en tractos digestivos de insectos barrenadores son, por porcentaje: Gammaproteobacteria 43 %, Firmicutes 36%, Actinobacteria 14% y otros 7% (Acuña-González, 2009).

Entre los filos que constituyen la microbiota de escarabajos barrenadores, las actinobacterias han sido reportadas como agentes que contribuyen a la nutrición de sus insectos anfitriones por poseer enzimas líticas (Scully et al., 2013), además son productores de una variedad de otros metabolitos secundarios con actividad antibiótica, antifúngica, antiparasitaria y antihelmíntica (Fischer et al., 2017; Jang & Kikuchi, 2020), por lo cual este grupo de bacterias podrían jugar un papel importante para la sobrevivencia de su anfitrión.

En este contexto, las comunidades microbianas asociadas con el insecto barrenador *Oncideres albomarginata chamela* (Coleoptera: Cerambycidae) merecen una atención especial por ser un ingeniero del ecosistema que modifica las propiedades físicas y químicas de su hábitat e incrementa la disponibilidad de recursos para otros miembros del ecosistema (Calderón-Cortés et al., 2011). Sin embargo, se desconoce la microbiota asociada a este insecto y no existen estudios previos que demuestren las funciones de las actinobacterias en los escarabajos cerambícidos en general, ni sobre las complejas asociaciones bacterianas y fúngicas de sus sistemas digestivos (Mohammed et al., 2018), aunque estudios previos en otros insectos como las hormigas han demostrado el papel de las actinobacterias para conferir protección contra microorganismos patógenos (Douglas, 2014; Huang et al., 2020).

Por lo anterior, en el presente proyecto se propone un estudio cultivo-dependiente con el propósito de analizar las interacciones de las actinobacterias como parte de la microbiota intestinal del escarabajo barrenador y elucidar su posible función en la protección contra hongos patógenos. Mediante ensayos de interacciones microbianas *in vitro*, este estudio permitirá evidenciar el papel que tienen las actinobacterias como simbiosis: si conservan la integridad de la microbiota y el bienestar del anfitrión. A su vez se tendrá un mejor entendimiento sobre la capacidad de las actinobacterias para conferir protección al anfitrión, de manera que sea posible discriminar entre interacciones directas con hongos patógenos o a través del establecimiento de interacciones mutualistas con otros miembros de la microbiota.

Si bien, las interacciones anfitrión–microbiota son importantes a una escala de la vida del individuo, también podría ser una determinante para la historia sobre la evolución del anfitrión (Lewis & Lize, 2015). Es por ello, que las consecuencias de las interacciones en la microbiota de los anfitriones comienzan a explorarse experimentalmente (Fischer et al., 2017). Además, estudios recientes han descubierto bacterias intestinales de insectos que producen compuestos antimicrobianos, algunos de los cuales son candidatos prometedores para el tratamiento de patógenos humanos multirresistentes, por lo cual este tipo de estudios también tiene el potencial de identificar nuevas cepas microbianas con la capacidad de sintetizar compuestos de interés médico (Alotaibi et al., 2022; Chevrette et al., 2019; Zhang et al., 2018; Zhou et al., 2021).

II. Hipótesis

Al coexistir en el tracto digestivo del insecto, el crecimiento de los hongos simbios de *O. albomarginata chamela* no es afectado por las actinobacterias; a su vez, las actinobacterias podrían influir en el desarrollo de la infección por hongos entomopatógenos.

III. Objetivos

General

Analizar mediante diferentes modelos de ensayos microbiológicos in vitro las interacciones insecto-actinobacterias que ocurren en el tracto digestivo del escarabajo barrenador *O. albomarginata chamela* y su posible efecto protector ante infecciones fúngicas.

Específicos

- Aislar las actinobacterias intestinales del escarabajo *O. albomarginata chamela* mediante medios selectivos e identificarlas genéticamente usando el marcador molecular que corresponde a la región hipervariable v3-v4 del gen ribosomal 16S.
- Determinar el tipo de interacciones que establecen las actinobacterias intestinales del escarabajo *O. albomarginata chamela* aisladas e identificadas ante los hongos simbios de los géneros *Penicillium* y *Stagonospora* y ante los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

IV. Marco teórico

1 Microbiota intestinal de insectos

a) Importancia

Al paso de 4 billones de años, la evolución ha creado millones de especies en este planeta. Aunque se debe mayormente a la incesante diferenciación de especies preexistentes, éste no es el único proceso que condujo a la biodiversidad que existe hoy en día. Las interacciones bióticas que se establecen en la naturaleza entre dos o más especies también promueven la biodiversidad. Las interacciones bióticas incluyen las relaciones de competencia, parasitismo, amensalismo, comensalismo y mutualismo. Siendo la última, una de las interacciones bióticas para las cuales se han reportado efectos profundos en la evolución (Ishikawa, 2003; Boege & del Val, 2011).

Los microorganismos surgieron y se diversificaron antes de la aparición de grandes organismos multicelulares; sus cuerpos proporcionaron nuevos hábitats potenciales para los organismos unicelulares: hábitats que eran persistentes, estables y ricos en nutrientes (Moran, 2006).

Como organismos multicelulares, los insectos parecen los más habituados a convivir con los microorganismos tanto dentro como fuera de sus cuerpos; dado que están rodeados por una gran variedad de ellos, particularmente en sus intestinos (Ishikawa, 2003). El análisis completo de la diversidad bacteriana del insecto anfitrión es necesario para conocer tanto su fisiología como la ecología microbiana que permite una mejor comprensión de las funciones ecológicas de los simbioses y las interacciones con sus anfitriones (Yun et al., 2014).

b) Funciones

El arsenal enzimático que poseen los microorganismos contribuye directamente a su propio bienestar y de manera incidental al de miembros de otras especies. La microbiota intestinal influye en los rasgos fisiológicos del insecto anfitrión a través de distintas estrategias que van desde contribuir a la provisión de nutrientes esenciales, intervenir en la defensa contra depredadores y patógenos, y participar en los procesos de detoxificación de compuestos (Engel & Moran, 2013; Sabree, 2014; Wong et al., 2014).

Nutrición

- Degradación de la biomasa vegetal: la principal barrera para obtener nutrientes del material vegetal es la incapacidad de la mayoría de los animales para procesar la biomasa debido a la alta complejidad de la pared celular de las plantas, compuesta principalmente de lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina). Algunos insectos tienen como única fuente de alimento la biomasa lignocelulósica; no obstante, ningún

organismo vivo tiene el reservorio metabólico completo necesario para convertir los componentes de la pared celular de las plantas en nutrientes. Los simbioses intestinales poseen enzimas lignocelulósicas denominadas CAZymes (Carbohydrate-Active enZymes) capaces de despolimerizar la lignocelulosa y fermentarla para producir ácidos grasos de cadena corta que el anfitrión puede oxidar para obtener energía (da Costa et al., 2019; Dethlefsen & Relman, 2007; Salem & Kaltenpoth, 2022; Sun & Scharf, 2010).

- Fijación de N₂: en la dieta de los animales herbívoros el nitrógeno es el factor limitante a pesar de ser una parte esencial de las biomoléculas. Su fuente principal reside en la atmósfera. Es probable que muchos insectos dependan de bacterias mutualistas que sean capaces de fijar el nitrógeno molecular de la atmósfera porque expresan el complejo enzimático nitrogenasa que, mediante múltiples reacciones de transferencia de electrones, el nitrógeno molecular es reducido a amoníaco (NH₃) que posteriormente se utilizará en la síntesis de biomoléculas (Engel & Moran, 2013; Kneip et al, 2007; Salem et al, 2014).
- Provisión de vitaminas B: son proporcionadas por microorganismos residentes especialmente en insectos que se alimentan de sangre de vertebrados y algunos insectos fitófagos y xilófagos, pero experimentalmente es difícil de demostrar porque las vitaminas son requeridas en cantidades muy pequeñas (Douglas, 2009).
- Síntesis de esteroides: los insectos son incapaces de sintetizarlos; se relaciona exclusivamente con los simbioses eucariotas, particularmente de levaduras, porque las bacterias carecen de la capacidad de sintetizar esteroides (Douglas, 2015).

Protección contra depredadores y patógenos

Hay evidencia de que los microorganismos residentes participan en las interacciones entre insectos y sus enemigos naturales, ya que en ausencia de la microbiota son más susceptibles a infecciones (Sansone et al., 2015). Estos microorganismos pueden participar a través de:

- Competencia por nutrientes o espacio entre simbioses: proporciona una barrera adicional a la colonización por microorganismos tanto patógenos estrictos (Dethlefsen & Relman, 2007) como facultativos, que pueden verse involucrados en interacciones antagónicas bajo las condiciones que lo permitan (Ji-Hyun et al, 2014).
- Producción de toxinas activas contra el invasor: involucra adaptaciones específicas para el hábitat del insecto. Son de particular importancia para los insectos que viven en entornos húmedos, donde las infecciones pueden desarrollarse rápidamente. Pero la comprensión de los mecanismos subyacentes es todavía inconclusa, ya que algunos microorganismos podrían defender a su insecto anfitrión contra otros microorganismos competidores que, por casualidad, incluyen patógenos de insectos (Douglas, 2015).

Detoxificación de nutrientes

Ciertas fuentes de nutrientes están disponibles solo si las toxinas y algunos componentes de la pared celular de las plantas son neutralizados. Muchos insectos se especializan en plantas tóxicas o superan los productos químicos utilizados para el control de insectos y las bacterias intestinales pueden servir como un portal para digerir y desintoxicar las fuentes de alimentos locales. Los insectos herbívoros suelen producir secreciones orales que interactúan con las plantas alimenticias, estimulando o suprimiendo las respuestas de defensa de éstas. Los microorganismos en la luz intestinal pueden producir compuestos o enzimas que median estas respuestas (Buchon et al., 2013; Charroux & Royet, 2012; Douglas, 2015; Jing et al., 2020; Salem & Kaltenpoth, 2022).

2 Ecología microbiana

a) Importancia

Los microbiomas ocupan casi todos los ambientes de la Tierra (Faust & Raes, 2012). Las asociaciones microorganismo-microorganismo y microorganismo-anfitrión son la pieza clave para el establecimiento de una comunidad, ya que les permite establecerse en una variedad de ambientes. El éxito de la comunidad depende de la diversidad de especies, dado que entre mayor sea la redundancia metabólica, mayor será la competencia por los recursos disponibles y menor será la posibilidad de que un invasor pueda establecerse en ella. Por tanto, la composición de una comunidad es el resultado de un proceso de coevolución que conduce a la adaptación y especialización (Barton & Nortup, 2011; Mesquita-Braga et al., 2016).

Los sistemas ecológicos microbianos como sistemas de estudio modelo permiten comprender mejor los sistemas naturales en general y predecir futuras interacciones, ya que ofrecen una estrategia para probar hipótesis sobre cómo funcionan los procesos ecológicos (Barton & Nortup, 2011; Mesquita-Braga et al., 2016).

b) Interacciones microbianas

El término "simbionte" se aplica típicamente a los organismos que son benéficos para el anfitrión, no obstante, se utiliza también para describir a los socios de los que se desconoce la totalidad de efectos que pueden llegar a tener uno sobre otro (Barton & Nortup, 2011). Los microorganismos exhiben una impresionante variedad de comportamientos sociales (West et al., 2007), dado que no existen como poblaciones de una sola especie, crean un sistema complejo y dinámico con sus hábitats (Antoniewicz, 2020; Faust & Raes, 2012).

Para catalogar los tipos de simbiosis microbianas se sigue la clasificación usada en la ecología general que se basa en el efecto neto sobre los participantes: positivo (una ganancia), negativo (una pérdida/costo) o ninguno (Faust & Raes, 2012). Los criterios para medir los costos y beneficios son:

- Posibilidades de supervivencia
- Condición promedio de su bienestar
- Variaciones de densidad poblacional (Lidicker, 1979).

En combinación, existen entonces cinco categorías centrales de interacciones ecológicas (Figura 1).

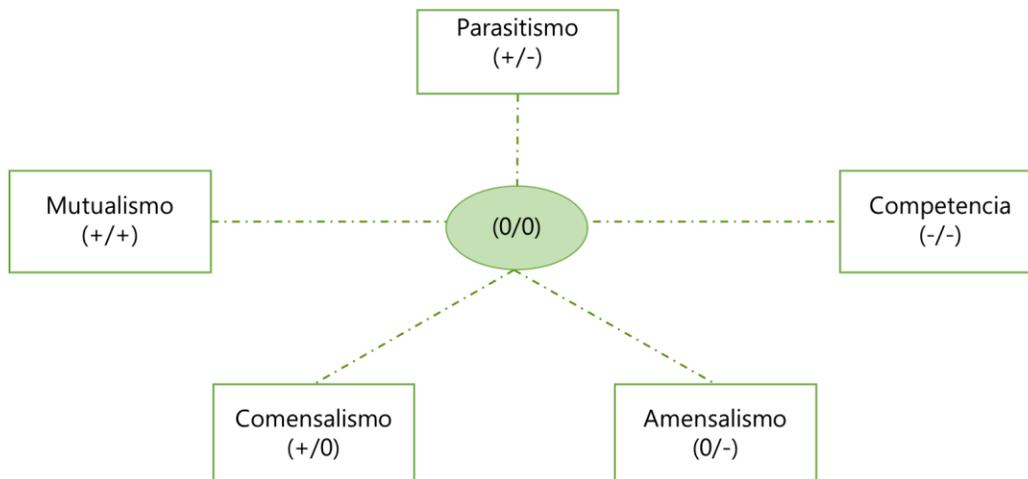


Figura 1: Clasificación de las interacciones ecológicas establecidas entre miembros de dos especies

Modificado de Faust & Raes (2012)

- Mutualismo (+/+). Necesaria para que ambas especies sobrevivan en el hábitat y se requiere de especies específicas. El crecimiento de uno se ve beneficiado por el crecimiento del otro.
- Parasitismo (-/+). Donde la totalidad o parte de los recursos de una especie son consumidos por otra. Si el efecto negativo llega a ser controlado se podría establecer una relación a largo plazo; de lo contrario el anfitrión podría morir.
- Comensalismo (+/0). El comensal es beneficiado mientras que el anfitrión no es beneficiado ni perjudicado. En muchos casos no se requiere de una especie en particular ya que el comensal puede crecer por sí mismo si se separa del anfitrión.
- Amensalismo (-/0). Es una interacción competitiva unilateral donde una especie tiene un efecto negativo sobre la otra, pero ésta no tiene ningún efecto detectable en la primera.
- Competencia (-/-). Al intentar adquirir los mismos nutrientes en el ambiente algunas de las poblaciones se verán comprometidas y puede atribuirse a la disponibilidad de fuente de nitrógeno, carbono, vitaminas, luz, agua o donantes o aceptores de electrones. Las posibles consecuencias de la competencia son dos: (1) la exclusión de especies y (2) el establecimiento de una comunidad donde coexisten múltiples especies (Barton & Nortup, 2011; Faust & Raes, 2012; Morin, 2011).

Los microorganismos rara vez se limitan a un solo tipo de interacción (Barton & Nortup, 2011), su naturaleza y magnitud dependerá de los tipos de microorganismos presentes, de su abundancia y de los estímulos presentes en el ambiente (Mesquita-Braga et al., 2016). Cualquier microorganismo que habite en un anfitrión individual o en un linaje de ellos puede desarrollar adaptaciones que generen que el anfitrión lo conserve para obtener beneficios, ya que esto le ayudará a mantener sus recursos inmediatos (Moran, 2006). De esta manera, un microorganismo que inicialmente mantenía una relación negativa, a través del tiempo y del proceso evolutivo puede convertirse en una relación positiva (Dethlefsen & Relman, 2007).

3

Diversidad de los microbiomas intestinales de insectos

La microbiota intestinal de los insectos es tan heterogénea como la ecología de los insectos mismos; forman parte de ella microorganismos de todos los dominios: hongos, arqueas, protozoos, virus y bacterias, siendo las últimas las más abundantes (Muñoz-Benavent et al., 2021). Su composición se ha analizado utilizando métodos tanto dependientes del cultivo como independientes de él (Engel & Moran, 2013) y se ha encontrado que varía ampliamente entre taxa de insectos como consecuencia de la fisiología intestinal (Douglas, 2011) y de la dieta en especial para los insectos que ingieren sustancias derivadas de la lignocelulosa (ver subtema 4-c), (Colman et al., 2012).

a) Bacteriana

En general está representada fuertemente por cuatro filos de bacterias: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacterias (Douglas, 2015) en porcentajes similares entre diferentes grupos de insectos: 5%, 6%, 21% y 62% respectivamente, y el resto de las bacterias quedan sin clasificar (Jones et al., 2013; Yun et al., 2014).

Pero algunos insectos albergan comunidades intestinales bacterianas especializadas; las más distintivas se han encontrado en insectos sociales como las termitas, los escarabajos, las hormigas y las abejas (Engel & Moran, 2013). Por ejemplo, 90% de las especies bacterianas en el intestino de las termitas no se encuentran en ningún otro lugar (McFall-Ngai et al., 2013), esto refleja una adaptación única para la utilización de especies leñosas (Shi et al., 2013). Existen entonces diferencias en el microbioma de diferentes grupos de insectos a pesar de que los filos tienen porcentajes de dominancia similares, las especies dentro de cada filo bacteriano son por lo general diferentes (Tabla 1), (Engel & Moran, 2013).

A continuación, se describe la abundancia y diversidad de los principales taxa bacterianos que conforman el microbioma de insectos.

Proteobacteria

Tiene la composición filogenética más grande (116 familias). Su morfología y fisiología es muy versátil, lo que les da una ventaja competitiva para sobrevivir en varios nichos ecológicos como el suelo, las plantas, el agua de mar, el agua dulce, la atmósfera y en el intestino de diversos animales (Na-Ri et al., 2015). Son Gram negativas, muestran una excepcional variedad en cuanto a mecanismos de generación de energía, con especies que son quimiolitótrofas, quimioorganótrofas y fotótrofas; son igualmente diversas respecto a los mecanismos de utilización del oxígeno (O₂) con especies anaerobias, microaerófilas y aerobias facultativas. Sus formas varían desde los bacilos rectos y curvos, cocos, espirilos, formas filamentosas, hasta las formadoras de yemas. Pueden dividirse en seis clases basándose en las secuencias de los genes del rARN 16S: Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon- y Zetaproteobacteria (Madigan et al., 2015). Algunas proteobacterias de importancia para los insectos son:

Tabla 1: Diversidad de especies bacterianas predominantes entre distintos grupos de insectos

Insecto barrenador	Microbiota bacteriana	Fuente
<i>Rhagium inquisitor</i> , <i>Tetropium castaneum</i> , <i>Plagionotus arcuatus</i> y <i>Leptura rubra</i>	Gammaproteobacteria, Actinobacterias, Firmicutes, Verrucomicrobia y Acidobacterias	Grünwald et al., 2010
<i>Hepialus gonggaensis</i>	<i>Rahnella</i> sp. y <i>Carnobacterium</i> sp.	Yu et al., 2008
<i>Anoplophora. glabripennis</i>	Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes.	Schloss et al., 2006
<i>Saperda vestita</i>	Proteobacteria	Schloss et al., 2006
<i>Riptortus clavatu</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	Kikuchi et al., 2005
<i>Myrmeleon mobilis</i>	<i>Wolbachia</i> sp. y Enterobacteriaceae	Dunn & Stabb, 2020
<i>Lymantria dispar</i>	γ -Proteobacteria, α -Proteobacteria, Actinobacteria, <i>Cytophaga</i> sp., <i>Flexibacter</i> sp. y <i>Bacteroides</i> sp.	Broderick et al., 2020
<i>Tetraoponera formicidae</i>	<i>Flavobacteria</i> sp., <i>Rhizobium</i> sp., <i>Methylobacterium</i> sp., <i>Burkholderia</i> sp. y <i>Pseudomonas</i> sp.	Borm et al., 2002

- *Wolbachia*: Es el género más abundante de este filo en los insectos. Son parásitos estrictos o mutualistas. Están especializadas metabólicamente dado que solamente pueden oxidar los aminoácidos glutamato o glutamina y son incapaces de oxidar glucosa o ácidos orgánicos. Su característica principal es que pueden inducir la partenogénesis (desarrollo de huevos sin fecundar), (Figura 2), la muerte de los machos y la feminización (conversión de los insectos macho en hembras), (Madigan et al. 2015).



Figura 2: Huevo de la avispa *Trichogramma kaykai*

Teñido con DAPI, se tiñen brillantemente las células de *Wolbachia* que se acumulan al final del huevo (parte destinada a convertirse en los órganos reproductores) induciendo la partenogénesis. Modificado de Salverda & Stouthamer, (2003).

- *Pseudomonas entomophila*: proteobacterias entomopatógenas. Son bacilos Gram negativos que se mueven por medio de un flagelo polar (Figura 3). Es aerobia estricta, catalasa y oxidasa positiva. Poseen una fuerte actividad hemolítica en placas de agar sangre y una importante actividad de proteasa, lo que contribuye a su virulencia. Es una bacteria metabólicamente versátil capaz de sobrevivir en el agua, el suelo, y la rizosfera (parte del ecosistema del suelo donde las raíces de las plantas, el suelo y su microbiota interactúan entre sí). Curiosamente es la primera cepa de *Pseudomonas* que es patógena en un organismo multicelular (Dieppois et al., 2015).

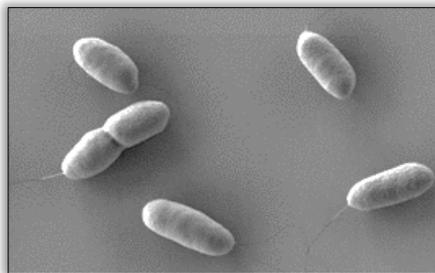


Figura 3: Microscopía electrónica de *Pseudomonas entomophila*

Modificado de Dieppois et al., (2015).

Firmicutes

Contienen las bacterias formadoras de endosporas, las bacterias del ácido láctico, entre otros. Tienen generalmente menos contenido de GC en su ADN. Son especies Gram positivas que pertenecen a los órdenes Bacillales y Clostridiales. El orden de las Lactobacillales son bacilos que forman endosporas, crecen en cadenas, son generadoras de ácido láctico como producto final principal de su metabolismo; son oxidasa y catalasa negativos y muestran un metabolismo exclusivamente fermentador. Son anaerobios aerotolerantes. Obtienen energía solo mediante la fosforilación a nivel de sustrato. Son normalmente más resistentes a las condiciones ácidas que el resto de las bacterias del ácido láctico ya que pueden crecer a valores de pH cercanos a 4. Casi nunca son patógenos. Carecen de cadena respiratoria y obtienen el ATP por fosforilación a nivel de sustrato y comprenden muchos mecanismos anaerobios generadores de energía como la fermentación de carbohidratos, aminoácidos, purinas y etanol (Madigan et al., 2015). Algunas bacterias firmicutes de importancia en los microbiomas de insectos incluyen:

- *Bacillus thuringiensis*: entomopatógeno. Son Gram positivos aerobios o facultativos, catalasa positivos en forma de bastón. Es una bacteria del suelo que forma esporas durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento; éstas contienen cristales llamados *cuerpos paraesporales* (Figura 4) formados por endotoxinas insecticidas específicas (proteínas *Cry*) que actúan por ingestión a través de la formación de poros perjudicando el epitelio intestinal de los insectos. Las toxinas *Cry* actúan solo si se unen a los receptores intestinales. Las diferentes cepas producen diferentes tipos de toxinas, cada una de las cuales afecta a un grupo taxonómico reducido de insectos (Ruiu et al., 2013; Sanahuja et al., 2011).
- *Clostridium bifermentans*: entomopatógeno. Es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto y móvil. Activo contra mosquitos y moscas negras, pero no muestra toxicidad a corto plazo para los vertebrados. Su actividad insecticida se ha asociado a la producción de una proteína homóloga a las endotoxinas de *B. thuringiensis* (Glare et al., 2017).

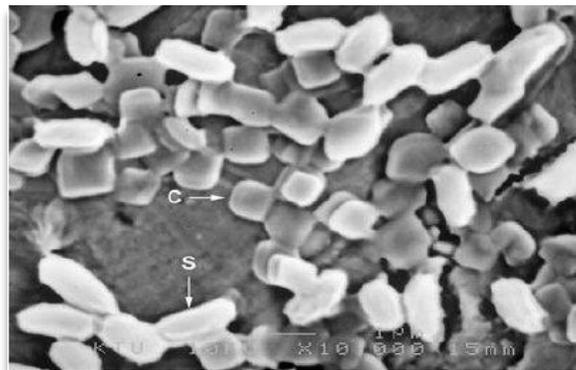


Figura 4: Morfologías de cristales y esporas de *Bacillus thuringiensis*

Ampliación 10000x bajo microscopía electrónica de barrido. Las flechas indican esporas (S) y cristales (C). Modificado de Sezen et al, (2008).

Bacteroidetes

Son bacilos Gram negativos no esporulados normalmente sacarolíticos y pueden ser aerobios estrictos, aerobios facultativos y anaerobios estrictos. Algunos miembros son inmóviles y otras cuantas poseen flagelos. El orden Bacteroidales contiene principalmente especies anaerobias estrictas que son fermentadoras. El género tipo es *Bacteroides* con especies que pueden fermentar azúcares o proteínas (según la especie) obteniendo acetato y succinato como productos principales de la fermentación; son normalmente comensales en el intestino de los humanos y de otros animales. Las especies de *Bacteroides* y otros géneros del filo Bacteroidetes, como *Flectobacillus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, y *Sphingobacterium* son singulares porque representan los pocos grupos de bacterias que sintetizan esfingolípidos. El orden Cytophagales comprende casi exclusivamente aerobios estrictos, aunque algunas especies tienen capacidades fermentadoras limitadas; suelen ser bacilos Gram negativos largos y delgados que a menudo presentan extremos puntiagudos y que se desplazan por deslizamiento. Las especies de este orden se especializan en la degradación de polisacáridos complejos. Están muy distribuidas por suelos y ambientes de agua dulce, donde probablemente llevan a cabo gran parte de la digestión bacteriana de la celulosa. Comprenden normalmente quimiorganotrofos, aerobios estrictos y aerobios facultativos. Algunas especies reducen los nitratos por respiración anaerobia (Madigan et al. 2015).

Actinobacteria

Contienen genomas de alto contenido en GC. Son Gram positivas y se pueden clasificar de acuerdo con su forma en cocobacilares o filamentosas, habitan el suelo y materiales vegetales. Suelen ser comensales inoocuos. La mayor cantidad de especies se agrupa en el orden Actinomycetales representadas por los géneros *Corynebacterium*, *Arthrobacter* y *Mycobacterium*. Son organismos aerobios o aerobios facultativos, inmóviles, extremadamente resistentes a la desecación y a la falta de nutrientes, aunque no forman esporas ni otras formas de reposo (Jose et al. 2021).

- Actinobacterias bacilares: El género *Corynebacterium* incluye patógenos de plantas, de animales y también son bacterias saprófitas. El género *Arthrobacter*, formado esencialmente por organismos del suelo, se distingue por tener un ciclo de desarrollo que consiste en la conversión de bacilo a coco y viceversa. Los miembros del género *Mycobacterium* en alguna fase de su ciclo de crecimiento poseen una propiedad de tinción exclusiva llamada ácido-resistencia la cual se debe a la presencia de los ácidos micólicos, que solo se encuentran en este género. Las micobacterias son pleomórficas y pueden mostrar un crecimiento filamentosos. Sin embargo, a diferencia de los filamentosos de los actinomicetos (discutido más adelante), los de las micobacterias no forman un micelio verdadero.

- Actinobacterias filamentosas: Son abundantes en el suelo. Muchos tienen un ciclo de desarrollo característico que culmina con la producción de esporas resistentes a la desecación. Los filamentos se alargan por sus extremos y forman hifas ramificadas. Este crecimiento ocasiona una red de hifas llamada micelio, análogo al formado por los hongos filamentosos. Cuando se agotan los nutrientes el micelio forma hifas aéreas que se diferencian dando esporas para la supervivencia y dispersión. El género *Streptomyces* es el más importante de este grupo dado que se conocen más de 500 especies. Sus filamentos suelen tener un diámetro de 0,5-1,0 μm , una longitud indefinida y normalmente carece de septos en la fase vegetativa (Figura 5). Cuando la colonia envejece, se forman filamentos aéreos característicos llamados esporóforos, que sobresalen de la superficie de la colonia (Madigan et al., 2015).



Figura 5: Microfotografía electrónica de barrido de *Streptomyces parvulus*
Obsérvese la forma característica filamentososa. Modificado de Sripreechusak et al., (2018).

b) Fúngica

Mientras que un gran número de estudios sobre la microbiota intestinal de insectos se han centrado en las bacterias, otros miembros de la comunidad, como los hongos, han sido comparativamente pasados por alto (Malassigné et al., 2021). Sin embargo, las simbiosis entre hongos e insectos son especialmente frecuentes en los insectos que se alimentan de madera (ver subtema 4b), (Engel & Moran, 2013). De los organismos eucariotas presentes en el microbioma intestinal, las levaduras son las que predominan en muchos insectos. Establecen principalmente relaciones mutualistas y en función del grado de dependencia su asociación puede clasificarse como primaria (que interactúan directamente con el anfitrión) o secundaria (que están asociados con especies bacterianas).

Los hongos asociados a insectos se encuentran principalmente en el filo Ascomycota y están representados por un pequeño número de especies (1-6 especies por individuo) que difieren entre grupos de insectos (Malassigné et al., 2021). Sin embargo, los géneros encontrados con mayor frecuencia son:

- *Alternaria sp.*: son principalmente saprófitos pero algunas especies han adquirido capacidades fitopatógenas. En su forma filamentosa se identifican cadenas simples o ramificadas en conidióforos cortos y rectos. Sus características principales son la producción de conidias melanizadas, que contribuyen a su patogenicidad, y la producción de toxinas específicas del anfitrión en el caso de las especies patógenas (Fedoseeva et al., 2021; Ma et al., 2021; Thomma, 2003)
- *Cladosporium*: es un género especial por su gran capacidad de adaptación a una variedad de entornos y anfitriones que van de ambientes terrestres hasta marinos, y de plantas hasta animales (Liu et al., 2021). En su forma filamentosa tienen conidios pigmentados oscuros que se forman en cadenas simples o ramificadas. Varias de sus especies son fitopatógenas como *C. cladosporioides* y *C. herbarum* (El-Dawy et al., 2021).
- *Candida*: pueden crecer típicamente en forma de levadura, de pseudohifas o hifas. Muchas de sus especies son patógenas de animales porque poseen la capacidad de sufrir una transición morfológica reversible. La proporción de células que crecen en una morfología particular puede variar entre especies. La especie oportunista más conocida es *Candida albicans* que en su forma de levadura se describe actualmente como un comensal de la mucosa humana y animal. Otras especies no patógenas han sido aisladas de una amplia gama de ambientes naturales, incluyendo agua dulce para *C. tropicalis* y *C. krusei*, plantas para *C. parapsilosis* y muestras de aire para *C. glabrata* y también se han reportado la presencia de estas especies en los suelos (Kadosh & Mundodi, 2020; Sautour et al., 2021).
- *Penicillium*: es uno de los grupos más grandes de hongos, bien establecido como fuente de antibióticos. Son ubicuos debido a sus necesidades nutricionales poco exigentes y a su capacidad para crecer en una amplia gama de entornos. Ha sido mayormente encontrado como simbionte de plantas. Son de crecimiento rápido y su micelio aéreo es de distintos colores dependiendo de la especie, tiende a crecer en forma radial y esporulada cuando el medio no es el óptimo para su crecimiento. Forma estructuras en forma de pinceles, de donde proviene el nombre del taxón (Kirk et al. 2008; Toghueo & Boyom, 2020).
- *Pichia*: a diferencia de los géneros anteriores, no produce hifas. Son ubicuas. Contiene a la especie *P. pastoris* que es considerada una levadura de relevancia biotecnológica porque expresa diferentes proteínas recombinantes que presentan una alta similitud con los sistemas avanzados de expresión eucariota (Karbalaie et al., 2020).

Por su parte, los principales hongos patógenos de insectos son *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Majumder et al., 2020). La capacidad de los hongos patógenos para los cambios morfológicos se extiende a lo largo de todo el ciclo de vida (Qiu et al., 2021).

- *Beauveria bassiana*: pertenece al filo *Ascomycota*. Se encuentra de manera natural en el suelo. Se caracteriza por presentar células conidiógenas globosas y en grandes grupos con poca distancia entre ellos; el desarrollo en medio de cultivo es lento, elevado de color blanco y de aspecto pelúcido (Guedez, 2014). Experimenta una transición entre tres morfologías celulares incluyendo hifas, conidios y blastosporas. Los conidios germinan, generan hifas y luego invaden directamente las cutículas de los insectos para entrometerse en el hemocele (cavidad que contiene sangre o hemolinfa) y genera blastosporas que consumen los nutrientes de la hemolinfa. Finalmente forma conidios para comenzar un nuevo ciclo de infección. Adicionalmente se usa como control de plagas, pero también sirve como un sistema modelo ideal para investigar la interacción entre el desarrollo de hongos y el anfitrión (Qiu et al., 2021).
- *Metarhizium anisopliae*: pertenece al filo *Ascomycota*. Es ubicuo, infecta a una amplia gama de insectos y es utilizado como control biológico de plagas. Presenta un crecimiento lento y su coloración varía desde el verde oliva hasta el verde oscuro debido a la maduración de los conidios (García et al., 2011). Su modo de acción implica: la adhesión a la cutícula, germinación y diseminación dentro del cuerpo en forma de hifas. Este mecanismo es facilitado por las enzimas hidrolasas, proteasas, quitinasas y lipasas. Al proliferar dentro de los tejidos de los insectos, las blastosporas producen toxinas que inducen patogénesis (explicado anteriormente), parálisis, alteraciones celulares y disfunción del intestino medio y tejidos musculares para finalmente provocar la muerte de 3 a 7 días después de la infección (Baleba et al., 2021).

4 Insectos barrenadores

a) Aspectos generales

Los insectos barrenadores son aquellos que se desarrollan en la madera, por lo menos durante alguna parte de su ciclo de vida, ya sea en la corteza o en los tallos de las plantas. Muchos de ellos comienzan su ciclo de vida (Figura 6) como huevos depositados bajo la corteza por las hembras adultas que viven en libertad. Después, las larvas se alimentan de la madera dentro de los tallos para posteriormente emerger como adultos y comenzar el ciclo de nuevo (Calderón-Cortés et al., 2011).

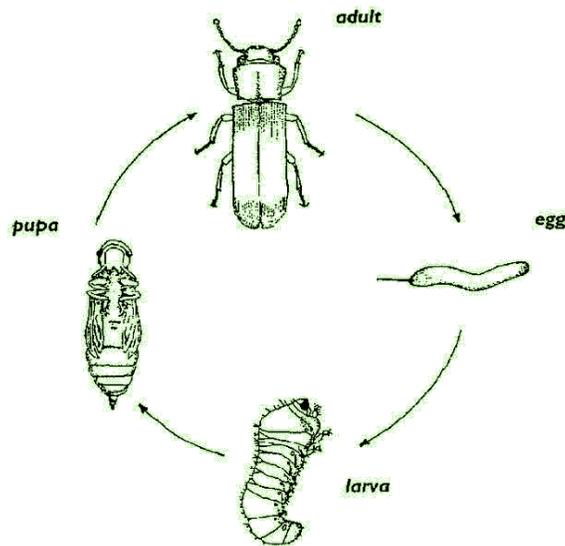


Figura 6: Ciclo de vida de un insecto barrenador
Modificado de Peters et al., (2002).

Al perforar los tallos las larvas producen sistemas de cavidades complejos que pueden ser ocupadas secundariamente por otros artrópodos. Jugando así un papel funcional importante en los ecosistemas forestales al alterar la arquitectura de los árboles, la composición e hidrología del bosque, contribuir al ciclo de nutrientes y a la regulación de la disposición de los recursos (Calderón-Cortés et al., 2011).

Los insectos barrenadores enfrentan una dieta excepcional, dado que la corteza y la madera son ricas en carbohidratos, principalmente celulosa y hemicelulosas, lignina y extractos como fenoles simples y ácidos fenólicos (Grünwald et al., 2010). Pero están bien adaptados para alimentarse de la madera, prosperan consumiendo las sustancias celulósicas gracias a sus planes corporales, incluidos los órganos de masticación, las estructuras intestinales y sus dos sitios independientes de degradación enzimática: endógeno y simbiótico (para algunas especies). Son considerados sistemas eficientes de bioconversión a microescala de biomasa celulósica (Watanabe & Tokuda, 2010).

La celulosa y la hemicelulosa representan algunos de los recursos de carbohidratos renovables más abundantes del planeta y constituyen la mayor fuente natural de azúcares fermentables (Scully et al., 2013). La celulosa es un polímero lineal que consta de unidades de d-glucopiranosilo con enlaces β -1,4. Es sintetizado por todas las plantas superiores, que colectivamente fijan $(6.0-6.3) \times 10^{16}$ g de carbono anualmente. Muchos microorganismos pueden sobrevivir de materiales celulósicos. Por el contrario, se creía que la mayoría de los animales no podían utilizar celulosa (Watanabe & Tokuda, 2010), pero actualmente se ha confirmado que diversos insectos tienen la capacidad de secretar sus propias enzimas, las cuales actúan de manera sinérgica con las enzimas de los microorganismos intestinales en la degradación de los polímeros de pared celular (Calderón-Cortés et al., 2012).

La lignina es un biopolímero aromático estereotípicamente irregular compuesto de subunidades de alcohol arílico fenilpropanoide y articulado por más de 12 tipos de enlaces químicos, constituidos principalmente por los enlaces de β -aril éter y carbono-carbono que son altamente resistentes a la hidrólisis (Grünwald et al., 2010).

Los insectos que se alimentan de la madera aprovechan una variedad de estrategias para liberar carbohidratos de los tejidos vegetales recalcitrantes como:

- Ingestión directa de enzimas fúngicas o bacterianas.
- Alimentación preferencial de árboles comprometidos (estresados o en descomposición cuyos polisacáridos estructurales han sido previamente alterados por el ambiente).
- Ingestión de microorganismos que degradan la madera.
- Endosimbiosis con microorganismos que degradan la madera.
- Sistema dual (simbiontes-insecto) de digestión de lignocelulosa (Grünwald et al., 2010).

La mayoría de los insectos que se alimentan de la madera mantienen asociaciones obligadas con los microorganismos. Se cree que estos afiliados microbianos hacen contribuciones importantes a la digestión de la lignocelulosa en una variedad de insectos filogenéticamente diversa, incluidas varias especies de escarabajos en los que se han detectado productos de fermentación microbiana en el intestino (Scully et al., 2013). Por tanto, no es sorprendente que muchos de los insectos barrenadores vivan en simbiosis con los microorganismos (Grünwald et al., 2010).

b) Microbiota intestinal de los insectos barrenadores

Los insectos muestran una amplia gama de grados de dependencia hacia los microorganismos intestinales; mientras unos son colonizados solo de manera oportunista por microorganismos comunes del ambiente, otros dependen directamente de ellos para

realizar sus funciones básicas (Engel & Moran, 2013). Las proporciones más altas de biomasa microbiana intestinal total con respecto a la masa del anfitrión se encuentran en algunos comedores de madera (xilófagos), incluidas las termitas, los grillos, las cucarachas y los escarabajos barrenadores de la madera (Engel & Moran, 2013).

Las comunidades microbianas del intestino posterior de insectos xilófagos como las termitas y los insectos folívoros son esenciales para su alimentación, ya que estos contribuyen de manera importante en la degradación de celulosa y provisión de nutrientes esenciales que se encuentran en concentraciones limitantes en los tejidos vegetales (Sapp, 2004).

Los insectos xilófagos de madera en descomposición albergan el microbioma intestinal más diverso (Colman et al., 2012) por tanto, se han realizado diversos estudios para identificar las especies bacterianas (Tabla 2) y fúngicas (Tabla 3) que lo componen; estos estudios se basan en el análisis de la microbiota de estadios larvarios de insectos barrenadores específicos que revelan un alto grado de similitud en la composición microbiana entre los alimentados con la misma dieta.

Tabla 2: Microbiota intestinal bacteriana reportada para insectos barrenadores

Insecto barrenador	Microbiota bacteriana	Fuente
<i>Rhagium inquisitor</i> , <i>Tetropium castaneum</i> , <i>Plagionotus arcuatus</i> y <i>Leptura rubra</i>	Gamma proteobacteria, Actinobacterias, Firmicutes, Verrucomicrobia y Acidobacterias	Grünwald et al., 2010
<i>Hepialus gonggaensis</i>	<i>Rahnella</i> sp. y <i>Carnobacterium</i> sp.	Yu et al., 2008
<i>Anoplophora. glabripennis</i>	Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidetes.	Schloss et al., 2006
<i>Saperda vestita</i>	Proteobacteria	Schloss et al., 2006
<i>Riptortus clavatu</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	Kikuchi et al., 2005
<i>Myrmeleon mobilis</i>	<i>Wolbachia</i> sp. y Enterobacteriaceae	Dunn & Stabb, 2020
<i>Lymantria dispar</i>	γ -Proteobacteria, α -Proteobacteria, Actinobacteria, <i>Cytophaga</i> sp., <i>Flexibacter</i> sp. y <i>Bacteroides</i> sp.	Broderick et al., 2020
<i>Tetraponera formicidae</i>	<i>Flavobacteria</i> sp., <i>Rhizobium</i> sp., <i>Methylobacterium</i> sp., <i>Burkholderia</i> sp. y <i>Pseudomonas</i> sp.	Borm et al., 2002

Tabla 3: Microbiota intestinal fúngica reportada para insectos barrenadores.

Insecto barrenador	Microbiota fúngica	Fuente
<i>Entomobrya nivalis</i> , <i>Orchesella flavescens</i> y <i>Pogonognathellus longicornis</i> .	Ascomycota, Zygomycota y Basidiomycota.	Anslan et al., 2016
<i>Anoplophora glabripennis</i> .	Clases del filo Ascomycota: Sodariomycetes y Saccharomycetes.	Mason et al., 2017
<i>Agilus mali</i> .	Ascomycota y Basidiomycota.	Zhang et al., 2018
<i>Acmaeops septentrioni</i> , <i>Acanthocinus aedilis</i> , <i>Callidium coriaceum</i> , <i>Trichoferus campestris</i> y <i>Chlorophorus herbstii</i> .	Familias del filo Ascomycota: Pichiaceae, Trichocomaceae y Saccharomycetaceae. Familias del filo Basidiomycota: Sporidiobolales, Tremellales y Meruliaceae.	Mohammed et al., 2018
<i>Xyleborus affinis</i> , <i>Xyleborus ferrugineus</i> y <i>Xylosandrus crassiusculus</i> .	Géneros del filo Ascomycota: <i>Ambrosiella</i> sp., <i>Raffaelea</i> sp., <i>Diplodia</i> sp. y <i>Fusarium</i> sp., Géneros del filo Basidiomycota: <i>Cryptococcus</i> sp. y <i>Bandoniozyma</i> sp.	Kostovcik et al., 2015
<i>Ips typographus</i> , <i>Ips cembrae</i> , <i>Ips sexdentatus</i> , e <i>Ips duplicatus</i> .	Géneros del filo Ascomycota: <i>Grosmannia</i> , <i>Ophiostoma</i> , <i>Endocondiophora</i> , <i>Ceratocystis</i> y <i>Leptographium</i> .	Chakraborty et al., 2020

5

Aplicaciones del estudio de la microbiota intestinal de insectos

Varias especies de bacterias y hongos producen sustancias bioactivas que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Como resultado de esta producción de antibióticos en la naturaleza se evita que los organismos susceptibles se conviertan en dominantes en la población y los productores de antibióticos obtienen la ventaja competitiva para desarrollarse (Barton & Nortup, 2011). Esta capacidad además de beneficiar al microorganismo productor representa una alternativa tanto para el control de plagas en la agricultura, como para la búsqueda de moléculas bioactivas de interés médico (Van Moll et al., 2021). A pesar del auge de los antimicrobianos sintéticos, la naturaleza sigue siendo una fuente valiosa de nuevos compuestos bioactivos. De todos los antimicrobianos actualmente en el mercado, el 69% se deriva de un compuesto natural, siendo el 97% de estos de origen microbiano (Van Moll et al., 2021). Por ello, para aumentar las posibilidades de encontrar nuevas moléculas bioactivas con novedosos modos de acción, es necesario cambiar el enfoque de búsqueda de las fuentes naturales extraídas a las relativamente poco exploradas (Van Moll et al., 2021).

Una de esas fuentes potenciales de nuevos antimicrobianos son los insectos; muchos son benéficos para las plantas al desempeñar papeles importantes en la dispersión de semillas, la polinización o de defensa. Por otro lado, también existen insectos dañinos que son considerados plagas ya que se alimentan de cultivos, productos almacenados o plantas forestales u ornamentales (Sherman 2009). Por ende, una mejor comprensión de sus comunidades bacterianas brinda una alternativa para renovar las estrategias de manejo de plagas (mencionadas en la Figura 7), porque los antibióticos dirigidos a los simbios de plagas para disminuir la población de anfitriones pueden inducir la aparición y propagación de bacterias resistentes a ellos, los estudios se han centrado en el desarrollo de procesos alternativos a los antibióticos (Mereghetti et al., 2017).

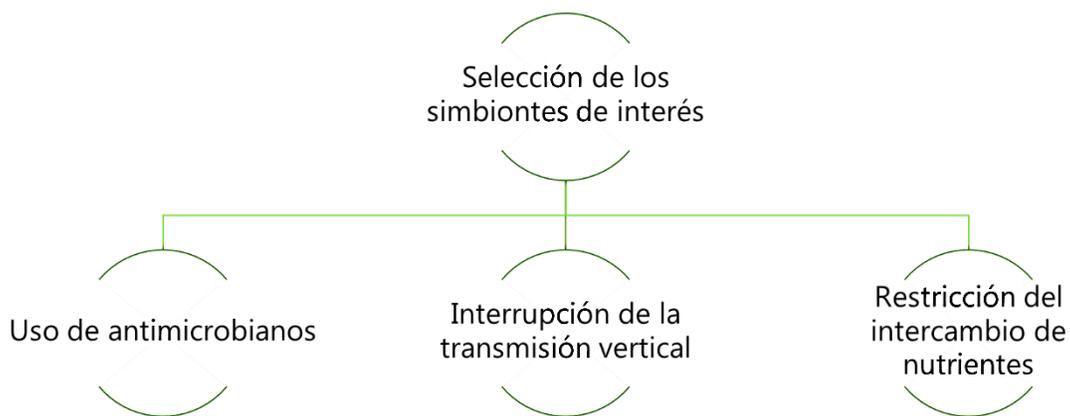


Figura 7: Estrategias de manejo de plagas basadas en simbios de insectos.

Los simbioses que tienen potencial de explotación en el control de plagas de insectos deben tener uno de dos rasgos específicos: que el insecto dependa directamente de él o que altere algún rasgo importante que requiera para mantener el estado de plaga (que afecte el fenotipo del insecto), (Douglas, 2007).

Los medicamentos antibióticos representan algunas de las aplicaciones más exitosas de los productos naturales microbianos en la salud humana. A la luz de la batalla contra la creciente resistencia a los medicamentos, han ganado mayor atención recientemente. La cantidad de artículos publicados que cubren compuestos antimicrobianos derivados de insectos ha aumentado constantemente durante la última década (O' Brien & Wright, 2011; Van Moll et al., 2021).

A partir de la información publicada en estos artículos, es claro el interés en un grupo en particular de simbioses de insectos: las actinobacterias. Se ha demostrado que las actinobacterias, y específicamente las cepas del género *Streptomyces* encontradas en la microbiota intestinal de los insectos, son generalmente más bioactivas que las encontradas en material vegetal y el suelo (Van Moll et al., 2021). Desde el trabajo pionero que condujo al aislamiento del antibiótico *estreptomina* en 1943 por Waksman et al., se han descrito y utilizado miles de compuestos producidos por este grupo para tratar infecciones. (Antoraz et al., 2015).

Este género es relevante porque:

- Se ve implicado en la formación de comunidades en un rango muy amplio de insectos anfitriones.
- Se ha extraído de él más de dos tercios de todos los compuestos antibióticos conocidos (Chevrette et al., 2019).

Además, hay un enfoque reciente sobre el potencial de la microbiota intestinal de insectos que producen moléculas de interés biotecnológico e industrial (Muñoz-Benavent et al., 2021).

V. Estrategia experimental

1 Aislamiento de microorganismos

a) Obtención de organismos y sitio de estudio

Los organismos de estudio se colectaron en la estación Biológica Chamela, UNAM, localizada en la costa de Jalisco, México (19°30' N 105°03' W) y en los alrededores (Figura 8).

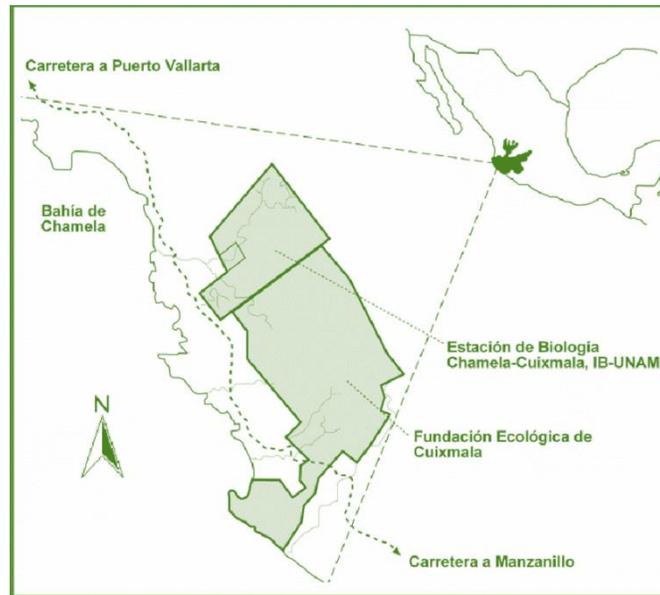


Figura 8: Localización de la Estación de Biología Chamela
Modificado de Calderón-Cortés (2010).

Las ramas colonizadas por el insecto barrenador *O. albomarginata chamela* se transportaron a la ENES Morelia y permanecieron en un invernadero con control de temperatura y humedad en bolsas de malla hasta la obtención de las larvas.

O. albomarginata chamela es un escarabajo longicornio (Figura 9) que corta ramas reproductivas de 2-3 cm del árbol tropical *Spondias purpurea* para ovipositar y desarrollar su progenie en ellas.

Esta especie es endémica de México; mide de 17 a 31mm de longitud y de 6.5 a 12mm de ancho; su periodo reproductivo comienza en octubre y termina en abril. El ciclo requiere de un periodo de 6 a 8 meses y comienza cuando los huevos son depositados bajo la corteza de las ramas removidas; el ciclo termina con la emergencia de los adultos. Las hembras adultas de *O. albomarginata chamela* son las únicas que poseen la capacidad de cortar las ramas reproductivas del árbol de *S. purpurea* para ovipositar en ellas, pero después de pocos días otras especies de insectos barrenadores que no tienen la capacidad de remover ramas

toman ventaja de aquellas removidas por *O. albomarginata chamela* y también ovipositan en estas ramas (Calderón-Cortés, 2010).

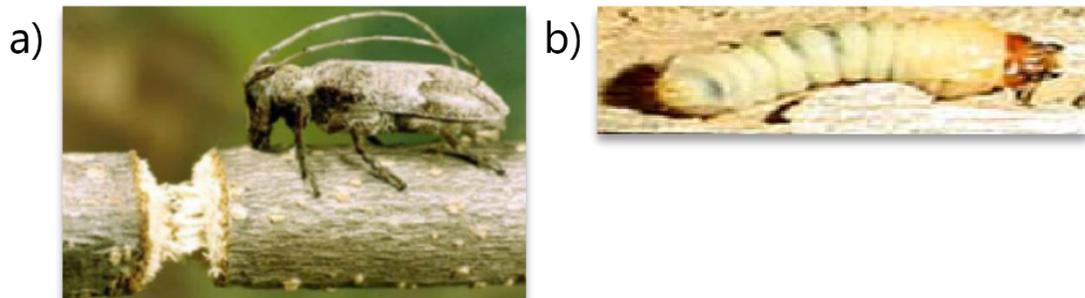


Figura 9: Estadios del ciclo de vida del escarabajo barrenador *Oncideres albomarginata chamela*
a) Estadio adulto, b) Estadio larvario. Obtenido de Calderón-Cortés (2010).

Como parte del proyecto general, previamente se aislaron e identificaron 5 cepas de actinobacterias y 2 cepas de hongos con la capacidad de sintetizar compuestos bioactivos a partir del tracto digestivo de *O. albomarginata chamela* a partir de medios selectivos para organismos celulolíticos usando carboximetil celulosa (CMC) como única fuente de carbono (Maldonado-Rodríguez, 2021).

Los aislados fúngicos identificados como *Penicillium* sp. y *Stagonospora* sp., así como los aislados bacterianos identificados como *Pseudoarthrobacter* sp., *Arthrobacter* sp. y *Brachybacterium* sp. se usaron para evaluar las interacciones microbianas en este estudio.

Sin embargo, para ampliar la búsqueda de actinobacterias, en este trabajo se utilizó un medio selectivo para su aislamiento, el cual permitió aislar cepas bacterianas adicionales con la capacidad de síntesis de compuestos bioactivos y/o antibióticos.

b) Obtención de excretas y disección del intestino

Para el aislamiento de microorganismos de las heces de *O. albomarginata chamela* se muestrearon aquellas contenidas en las ramas donde habita; para el aislamiento de microorganismos del tracto digestivo, las larvas que se obtuvieron del interior de las ramas al cortarlas a la mitad se lavaron con etanol al 70% mediante la incubación a 4°C durante 15 min para disminuir su metabolismo gradualmente y posteriormente eutanzarlas mediante una incubación a -20°C durante 30 min.

Después, se fijó al sujeto de los extremos longitudinales de su cuerpo a una superficie perforable que permitiera realizar un corte en la cabeza y ano para liberar presión para posteriormente llevar a cabo el corte longitudinal de un extremo a otro de su cuerpo que descubriera su interior y permitiera separar el tracto digestivo (Figura 10) de la grasa y el cuerpo.

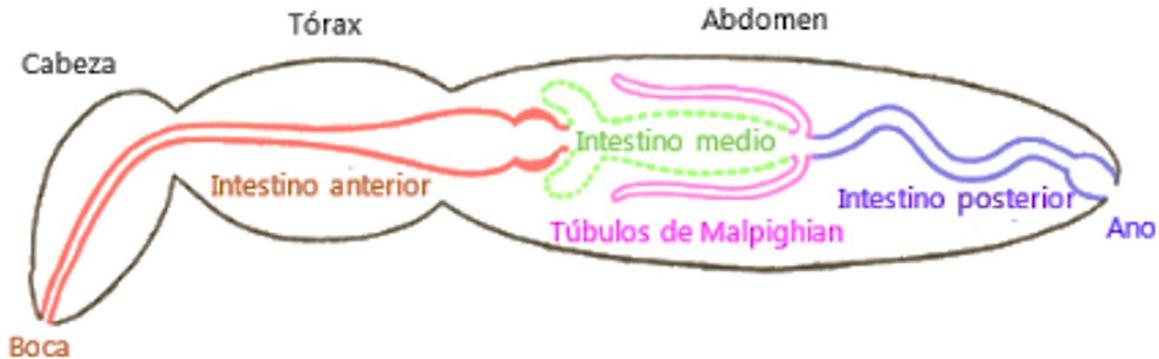


Figura 10: Esquema generalizado del sistema digestivo de insectos
Modificado de Imms (1934).

c) Inoculación de extractos

Las muestras de excretas y los tractos digestivos disectados de las larvas se homogenizaron de manera independiente en 1mL de Solución Buffer de Fosfatos (PBS) estéril con pistilo de plástico y vórtex; después se centrifugaron y se realizaron diluciones seriadas (10^{-2} - 10^{-4}) de los sobrenadantes que finalmente se inocularon con perlas de vidrio estériles en cajas Petri con el medio selectivo sólido en campana de flujo laminar.

Para el aislamiento de actinobacterias cultivables se utilizó el medio selectivo AIM6, (Actinobacterial Isolation Media) de Arocha-Garza et al., (2017) que contiene 10g almidón, 1g K_2HPO_4 , 1g $H_{14}MgO_{11}S$, 2g $H_8N_2O_4S$, 1g NaCl, 2g $CaCO_3$, 0.001g $FeH_{14}O_{11}S$, 0.001g $MgCl_2$, 0.001g $ZnSO_4$ 20g de agar por litro de cultivo; adicionado con ácido nalidíxico 50 μ g/mL y nistatina 100 μ g/mL para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y hongos respectivamente.

Los medios inoculados se incubaron a temperatura ambiente hasta el crecimiento de microorganismos (21 días aproximadamente). Los microorganismos cultivados continuaron por varias rondas de aislamiento en el mismo medio AIM6 hasta la obtención de un cultivo puro.

d) Caracterización morfológica

Los cultivos puros obtenidos se observaron en microscopio óptico para identificar su morfología microscópica mediante la tinción de Gram. Se seleccionaron aquellos aislados que tuvieran la morfología característica de actinobacterias.

2 Identificación de los aislados microbianos

Se realizaron cultivos en caldo nutritivo a partir de los cultivos puros, incubándolos a 28°C con agitación (500 rpm) por 2 días. Este cultivo líquido se usó para el mantenimiento de cepas puras en glicerol al 10% a -70°C, y para la identificación genética de los aislados microbianos.

a) Extracción de ADN bacteriano

Dado que las actinobacterias cuentan con una pared celular parcialmente ácido-alcohol resistente, se llevó a cabo el protocolo de lisis celular y extracción de ADN como se muestra en la (Figura 12).

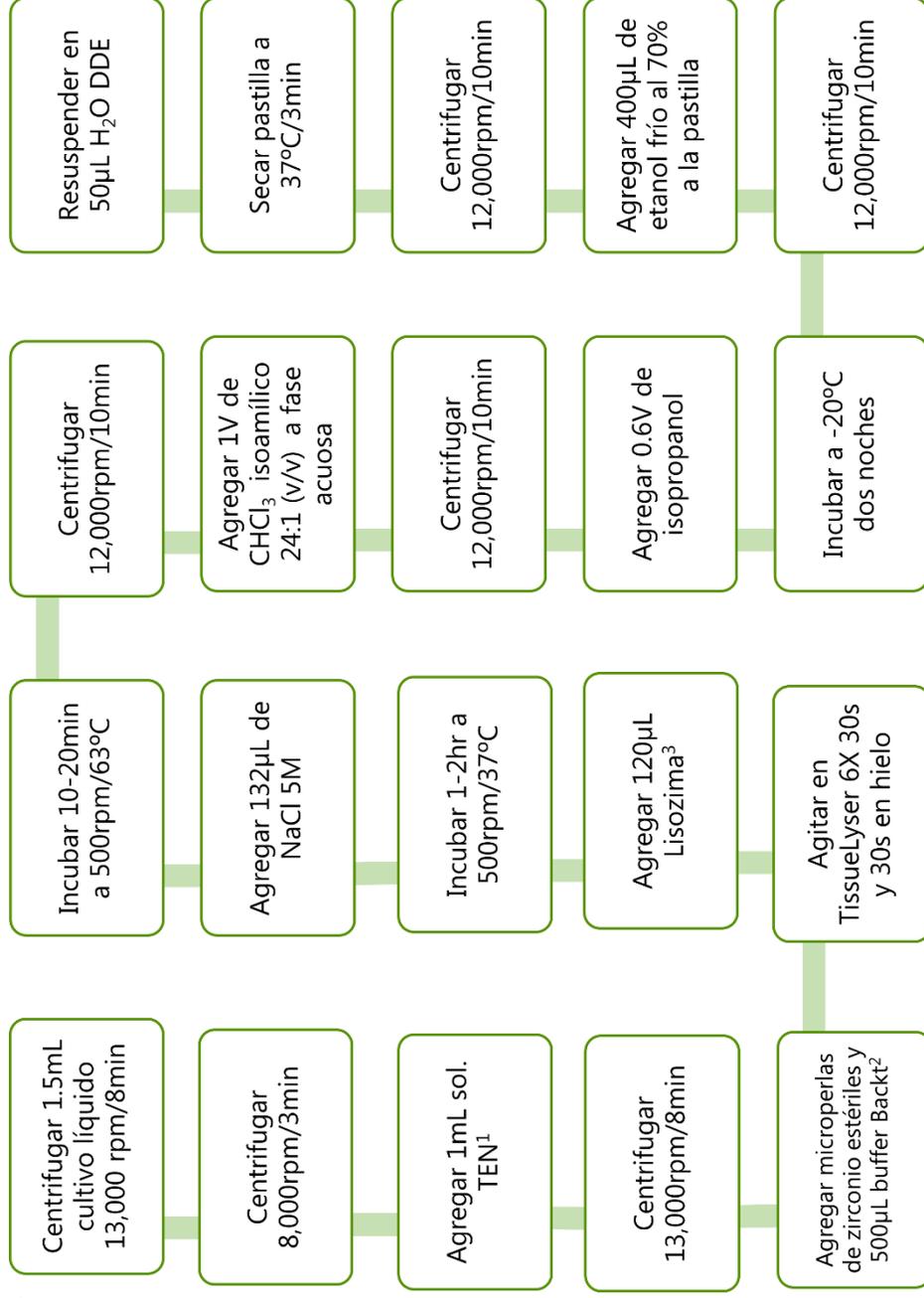


Figura 11: Protocolo de extracción de ADN bacteriano

¹ 10mM Tris-HCl pH=8; 1mM EDTA; 100mM NaCl

² 40mM Tris pH=7.8; 20mM

CH₃COONa; 1mM EDTA; 1% SDS)

³ 10mg/mL en Tris pH=8

b) Evaluación del ADN

Para verificar la integridad del ADN purificado, una alícuota del ADN se separó mediante electroforesis en una matriz de agarosa de la manera que sigue:

1. Se preparó una solución de agarosa a 1% (p/v) para obtener un fragmento de 8,000 – 500 pb de longitud en buffer Tris-Acetato EDTA (TAE 1X). Se disolvió calentando la mezcla por periodos cortos en horno de microondas y se atemperó.
2. Se agregaron 0.6 μ L del fluoróforo SYBR safe (1000x).
3. Se solidificó en charola con peines.
4. Se montó el gel en cámara de electroforesis, se retiraron los peines y se cubrieron con el buffer TAE 1X.
5. En un trozo de Parafilm se mezclaron las muestras de ADN extraído con el Buffer de carga 10X (1 μ l por cada 6 μ l de ADN en solución) que contiene glicerol, azul de bromofenol y el xylene cyanol que indican la movilidad del ADN en el gel.
6. Se cargaron las mezclas en los pocillos hechos por los peines, dejando en el primero el marcador de peso molecular (M).
7. Se cerró la cámara y se aplicó una corriente de 80V (Figura 12).
8. Se detuvo cuando el azul de bromotimol migró $\frac{3}{4}$ partes del gel.
9. Se extrajo el gel para fotodocumentarlo en un transiluminador de UV.

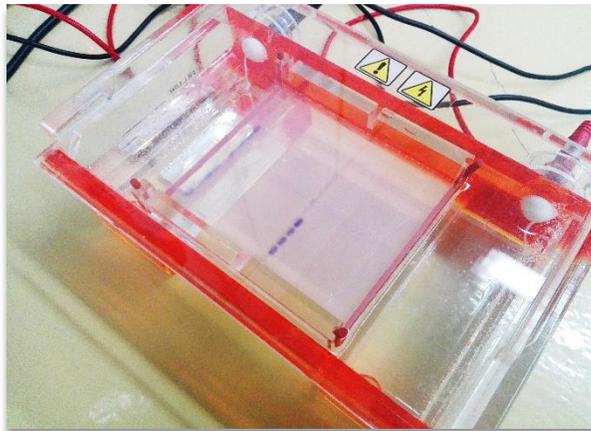


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa

b) Cuantificación de ADN

Mediante fluorimetría se obtuvo la concentración precisa de ADN de doble hebra presente en cada extracción haciendo uso del equipo Invitrogen Qubit 4 (life technologies) con el kit Qubit dsADN HS Assay *que* contiene fluoróforos selectivos que emiten luz bajo la exposición UV sólo cuando se unen al ADN.

El procedimiento realizado fue:

1. Se preparó la solución de trabajo (Figura 13) en relación 1:200 de fluoróforo y Buffer para mezclar 199 μ L de ésta por cada μ L de muestra y en relación 10:200 para cada estándar.
2. Se calibró el equipo al leer ambos estándares para que después apareciera la curva de concentración en la pantalla que abarca el intervalo de cuantificación de 0.2 a 100ng/ μ L.
3. Se midió la absorbancia de cada muestra; el equipo realizó el cálculo de concentración y las ubicó en la gráfica (Invitrogen, 2021).

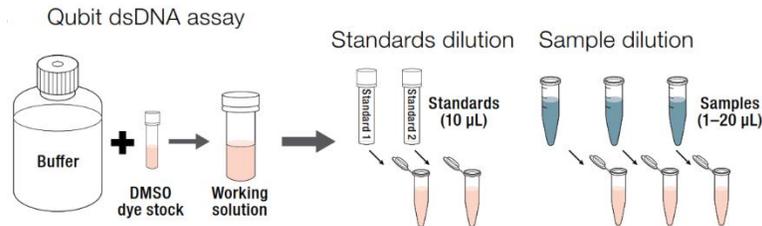


Figura 13: Preparación de muestras y estándares para cuantificar ADN

Modificado de Invitrogen (2021).

c) Amplificación de ADN

La identificación taxonómica de procariontes comienza con la amplificación de la región conservada V3-V4 del gen ribosomal 16S mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual requiere de un juego de primers u oligonucleótidos cebadores específicos. En este caso se usaron los primers Bakt 341F (5'-CCT ACG GGN GGC WGC AG-3') y Bakt 805R (5'-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3') y el sistema comercial Terra PCR Direct Polymerase Mix (Takara Bio, USA, Inc.)

La mezcla de reacción se preparó en microtubos de 0.2 ml estériles de la siguiente manera:

- 0.1 μ l Terra Polymerase (1.25U/ μ l)
- 12.5 μ l Buffer 2X Terra PCR Direct Buffer con Mg^{2+} , dNTPs (2X)
- 0.5 μ l Primer Bakt 341F
- 0.5 μ l Primer Bakt 805R
- 10.4 μ l H₂O Destilada, Desionizada y Estéril (DDE).

La mezcla de reacción se llevó al termociclador Master Cycler, Eppendorf, USA y se realizó la amplificación por PCR bajo las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial a 98°C/3 min
 - Desnaturalización 98°C/15s
 - Alineamiento de los primers (T_m) 61°C/30s
 - Extensión 68°C/30s
 - Extensión final 68°C/5min
- } 30 ciclos

Concluida la amplificación, los resultados de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% como se describió anteriormente.

d) Limpieza de productos de PCR

Una vez obtenidos los productos de PCR de banda única de 450 pb aproximadamente, se deben retirar el resto de los componentes (nucleótidos no incorporados) de la reacción previa al filtrarlos en la matriz cromatográfica. Para ello, se prepararon microcolumnas con 200µL de Sephacryl S-300HR, se centrifugaron a 2800rpm/3min, posteriormente se agregaron 200µL de H₂O DDE y se centrifugaron a 2800rpm/3min. Una vez que las columnas se encontraban equilibradas (cuando se recuperó el mismo volumen de agua que se agregó), las muestras se cargaron en las columnas equilibradas, las cuales se centrifugaron a 2800rpm/3min para la recuperación de las muestras purificadas.

e) PCR de secuenciación

La reacción de secuenciación se preparó con 2 µL de Buffer de secuenciación BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA, Inc), 1 µL del primer Reverse Bakt 805R, 1 µL de producto de PCR limpio y se aforó a 10µL con H₂O DDE. Las temperaturas en el termociclador fueron: 96°C/1min; seguido por 30 ciclos a 96°C/10s, 50°C/5s y 60°C/4min: para finalizar en 10°C.

f) Purificación de productos de PCR de secuenciación

Los productos de la reacción de secuenciación se filtraron en columnas Invitrogen Centri-Sep Spin Columns con la matriz cromatográfica Sephadex G-50 preparadas con 800 µL de H₂O DDE, las cuales se hidrataron 4hr a temperatura ambiente. Las columnas se colocaron en tubos receptores y se centrifugaron a 3000rpm/3min, se decantaron y se volvieron a centrifugar a 3000rpm/1min y se cambiaron a un tubo nuevo estéril de 1.5 mL. Se colocaron 10µL de H₂O DDE en los tubos que contenían los productos de la PCR de secuenciación y el contenido total se depositó en las columnas Sephadex G-50 centrifugando a 3000 rpm/3min. Las muestras se secaron a 32°C/15min, para después resuspenderlas en 13µL de HiDi (Formamide Applied Biosystems).

g) Secuenciación de Sanger por electroforesis capilar

Los productos de la PCR de secuenciación purificados se cargaron en una placa de 96 pozos y se llevaron al secuenciador Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer en el laboratorio de Ecología Molecular de la ENES Morelia, Para llevar a cabo el proceso automatizado de electroforesis capilar en una matriz de poliacrilamida y lectura de fluoróforos.

h) Edición de secuencias

Los cromatogramas obtenidos del secuenciador fueron editados en el programa BioEdit (Hall, 1999) para determinar la calidad de cada secuencia de nucleótidos revisando gráficamente a partir de la intensidad y el traslape de los picos en el cromatograma.

i) Análisis bioinformático

Para la asignación taxonómica se realizó el análisis de las secuencias mediante búsquedas en las bases de datos Basic Local Alignment Search Tool del National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y SILVA (<https://www.arb-silva.de/. U>).

3 Ensayos in vitro de interacciones microbianas: inhibición fúngica mediada por actinobacterias

Inicialmente se generaron cultivos primarios de las actinobacterias en el medio en el cual fueron aisladas; medio selectivo para microorganismos celulíticos CMC (Carboximetil celulosa) o medio AMI6, según corresponda, así como de los hongos simbiotes en el medio CMC compuesto por: 1.9g K_2HPO_4 , 0.94g KH_2PO_4 , 1.6g KCl, 1.43g NaCl, 0.15g NH_4Cl , 0.037g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.017g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.1g de extracto de levadura, 10g CMC y 20g de agar por litro de acuerdo con Cazemier et al. (2017) y de los hongos entomopatógenos en el medio agar papa dextrosa (PDA) compuesto por: extracto de 4g papa, 20g dextrosa y 1.5g agar por litro.

Para determinar el tipo de interacciones que establecen las actinobacterias intestinales se realizaron dos ensayos distintos:

a) De los hongos simbiotes

Cada actinobacteria aislada e identificada del intestino de *O. albomarginata chamela*: *Streptomyces* sp., *Brachybacterium* sp., *Pseudoarthrobacter* sp. y *Arthrobacter* sp. con los hongos simbiotes *Penicillium* sp. y *Stagonospora* sp. en medio CMC (Figura 14).

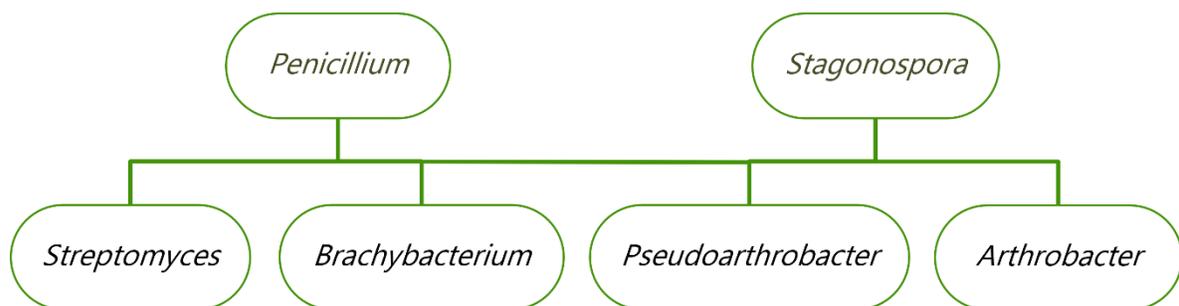


Figura 14: Esquema de ensayos de interacciones microbianas entre simbiotes

b) De los hongos entomopatógenos

La única actinobacteria que mostró inhibición en el ensayo con los hongos simbiotes (*Streptomyces* sp.), frente a los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en PDA; a su vez, se probaron dos condiciones distintas I) inoculación simultánea y II) con ventaja de crecimiento para la bacteria realizando la inoculación del hongo después de incubar la bacteria 7 días.

En ambos ensayos se analizó el tipo de interacción utilizando una técnica modificada de Arango et al., (2016) colocando un trozo de agar del cultivo primario del hongo, obtenido con pipeta Pasteur estéril (0.5cm diámetro) en el centro de la placa Petri con 20μL del cultivo líquido en caldo nutritivo de cada actinobacteria en las cuatro esquinas alrededor del hongo (Figura 15).

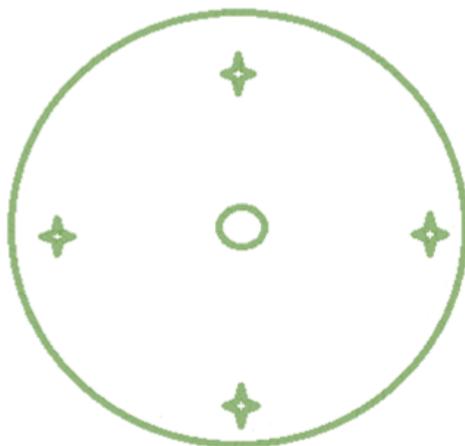


Figura 15: Esquema de los ensayos realizados del crecimiento de los hongos frente a las actinobacterias.

El cultivo primario del hongo, tomado con pipeta Pasteur, es representado por un círculo al centro de la placa Petri; las estrellas indican los 4 puntos donde se inoculó con 20 μ L del cultivo líquido de actinobacterias.

Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente por los periodos de tiempo que siguen:

- 15 días para *Penicillium* sp.
- 21 días para *Stagonospora* sp., *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* por inoculación simultánea
- 28 días para *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* por inoculación del hongo después de incubar la bacteria 7 días (ensayo II).

Cada interacción se probó por cuadruplicado incluyendo un control negativo también por cuadruplicado para comparar el crecimiento (área en cm^2) del hongo en ausencia de las diferentes especies de actinobacterias; para ello se inoculó un trozo de agar del cultivo primario de hongo al centro de la placa y se incubó en las mismas condiciones que los ensayos de interacciones.

Se registraron los datos de crecimiento de cada uno de los hongos semanalmente hasta que ocupara la totalidad de la placa. Los datos de crecimiento se analizaron comparando la diferencia de crecimiento (área) del hongo en el tratamiento con el control negativo (sin interacción) y el crecimiento del hongo frente a cada una de las especies de actinobacterias interactuantes. El área de crecimiento de los hongos se calculó utilizando el programa *ImageJ* (Schneider et al., 2012)

En total se evaluaron diez interacciones: dos hongos simbiotes con cuatro géneros de Actinobacterias (*Streptomyces* sp, *Pseudoarthrobacter* sp., *Arthrobacter* sp. y *Brachybacterium* sp.); así como de dos hongos entomopatógenos con un género de actinobacterias (*Streptomyces* sp).

VI. Resultados

1 Aislamiento de microorganismos

En total se obtuvieron 8 cultivos puros provenientes del tracto digestivo de *O. albomarginata chamela* y 6 de sus excretas expuestas en las ramas; cada cepa presentó características de morfología colonial diversas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia**)

Tabla 4: Morfología colonial de los aislados extraídos del tracto digestivo y de las excretas de *Oncideres albomarginata chamela*

Cepa*	Clave	Textura	Forma	Elevación	Superficie	Borde	Color	Luz transmitida	Luz reflejada	Aspecto
Ee1A	I	Dura	Irregular	Plana	Lisa	Ondulado	Amarillo	Opaca	Mate	Seco
Ee2A	II	Dura	Irregular	Cúpula	Lisa	Ondulado	Amarilla	Opaca	Brillosa	Húmedo
Ee1B	III	Dura	Circular	Umbonada	Lisa	Entero	Grisácea	Opaca	Mate	Seco
Ee2B	IV	Blanda	Irregular	Plana	Lisa	Ondulado	Amarilla	Opaca	Brillosa	Húmedo
Ee2C	V	Blanda	Irregular	Plana	Granular	Filamentoso	A/Blanco R/Blanco	Opaca	Mate	Seco
TD2A	VI	Blanda	Irregular	Convexa	Granular	Ondulado	Verde	Traslúcida	Mate	Seco
TD2D	VII	Blanda	Circular	Cúpula	Lisa	Entero	Blanca	Traslúcida	Brillosa	Húmedo
Ee1C	VIII	Dura	Circular	Convexa	Lisa	Entero	Blanca	Traslúcida	Brillosa	Húmedo
TD2C	IX	Blanda	Irregular	Umbonada	Granular	Filamentoso	A/Verde R/Blanco	Opaca	Mate	Seco
TD1B	X	Blanda	Circular	Umbonada	Granular	Ondulado	A/Verde R/Blanco	Opaca	Mate	Seco
TD2B	XI	Dura	Circular	Cúpula	Lisa	Entero	Blanca	Traslúcida	Mate	Seco
TD2F	XII	Dura	Blanco De Tiro	Plana	Granular	Entero	Blanca	Traslúcida	Mate	Seco
TD2B	XIII	Dura	Circular	Convexa	Lisa	Entero	Rosa	Traslúcida	Brillosa	Seco
TD1A	XIV	Blanda	Circular	Convexa	Lisa	Entero	Grisácea	Traslúcida	Brillosa	Húmedo

*Las cepas se nombraron dependiendo de su origen: TD para las provenientes del Tracto Digestivo y Ee para las provenientes de las Excretas expuestas.

De los aislados obtenidos, inicialmente se descartaron aquellos de morfología característica de hongos (V, IX y X). Del remanente, se realizó la tinción de Gram a los aislados con textura identificada como dura (I, II, III, VIII, XI, XII y XIII). Las características microscópicas de estos aislados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Morfología microscópica de los aislados bacterianos de textura identificada como dura

Clave	Gram	Forma	Tamaño	Agrupación
I	+	Bacilar	Pequeño	Cadena
II	-	Cocoide	Grande	Cadena
III*	+	Filamentosa	Grande	Aislada
VIII*	+	Cocobacilar	Pequeño	Aislada
XI	+	Bacilar	Grande	Empalizada
XII*	+	Filamentosa	Grande	Enredada
XIII*	+	Bacilar	Pequeño	Enredada

*Aislados de morfología microscópica típica de actinobacterias.

A partir de las observaciones en el microscopio de estos aislados, se identificaron 6 cepas bacterianas Gram positivas (I, III, VII, XI, XII y XIII) y 1 cepa bacteriana Gram negativa (II).

2

Identificación molecular de los aislados bacterianos

El proceso de identificación molecular se realizó sólo a los aislados bacterianos de características microscópicas típicas de actinobacterias: Gram positivos filamentosos y cocabacilares (III, VIII, XII y XIII). Comenzando con la purificación de ADN y corroborando su extracción mediante la electroforesis en gel de agarosa (Figura 16).

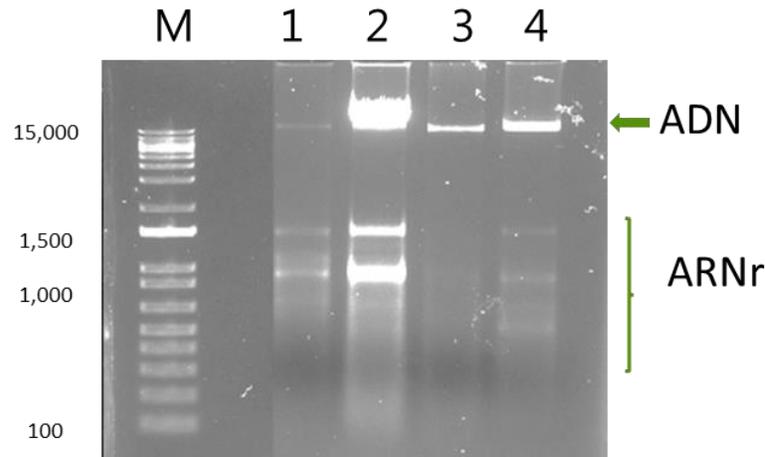


Figura 16: Análisis electroforético del ADN purificado de los aislados bacterianos Gram positivos filamentosos o cocabacilares obtenidos del tracto digestivo de *Oncideres albomarginata chamela*.

En la matriz electroforética los nucleótidos se ubican en forma de bandas; en la parte superior las de mayor peso molecular (>15,000 pb) correspondientes al ADN (indicado con una flecha) y en la parte inferior aquellas de menor peso molecular (entre 1,500 y 100 pb) correspondientes al ARN ribosomal (indicados con una llave). Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe (BIO-RAD Laboratories). M= Marcador de peso molecular 1 Kb Plus ADN Ladder (Invitrogen); 1= 5 µl de ADN del aislado III; 2=5 µl de ADN del aislado VIII; 3= 5 µl de ADN del aislado XIII; 4=5 µl de ADN del aislado XII.

El ADN purificado presentó variación en la concentración, pero para las cuatro cepas el ADN purificado fue de alto peso molecular, indicando su integridad (Figura 16). Específicamente, a partir de la cuantificación de ADN por fluorimetría, se obtuvo el valor de la concentración de ADN presente en cada extracto (Tabla 6) calculando a partir de las lecturas por duplicado de la absorbancia de cada uno (absorbancia teórica) para promediarlo (absorbancia calculada), y aplicando la proporcionalidad que sigue:

$$[ADN] = \frac{Abs. calculada}{[St]/Abs. St\bar{x}}$$

Donde:

[ADN]: Concentración de ADN en ng/µL

Abs. St \bar{x} : Promedio de 3 lecturas de la absorbancia de la solución estándar

[St]: Concentración de la solución estándar = 10 ng/µL

Se obtuvieron concentraciones de 10-31 ng/ μ L (Tabla 6).

Tabla 6: Valores de absorbancia y concentración de ADN obtenidos mediante fluorometría

Aislado	Absorbancia		ADN [ng/ μ L]
	Teóricas	calculada	
III	41.20	44.60	10.10
VIII	67.20	67.40	31.65
XII	52.80	52.80	12.43
XIII	42.60	42.80	10.05

A partir de la amplificación del gen ribosomal 16S, se obtuvo el fragmento esperado de 450pb aproximadamente para los 4 aislados bacterianos analizados (Figura 17).

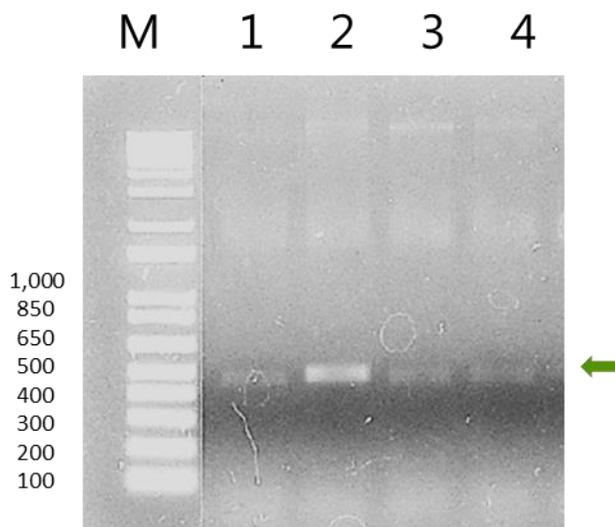


Figura 17: Análisis electroforético de los productos de la reacción de amplificación de un fragmento del gen ribosomal 16S de los aislados bacterianos Gram positivos filamentosos o cocobacilares obtenidos del tracto digestivo de *Oncideres albomarginata chamela*.

En la parte central de la matriz electroforética se ubican en forma de bandas los productos esperados de 450 pb (indicados con una flecha) y en las partes superior e inferior se encuentran restos del ADN bacteriano de distintos pesos moleculares. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe (BIO-RAD Laboratories). M= Marcador de peso molecular 1 Kb Plus ADN Ladder (Invitrogen); 1= 3.5 μ l de la PCR del aislado III; 2=3.5 μ l de la PCR del aislado VIII; 3= 3.5 μ l de la PCR del aislado XIII; 4=3.5 μ l de la PCR del aislado XII.

A partir de la limpieza de los productos de la PCR, se obtuvo una banda única (450 pb), la cual se secuenció para la identificación molecular de los aislados (Figura 18).

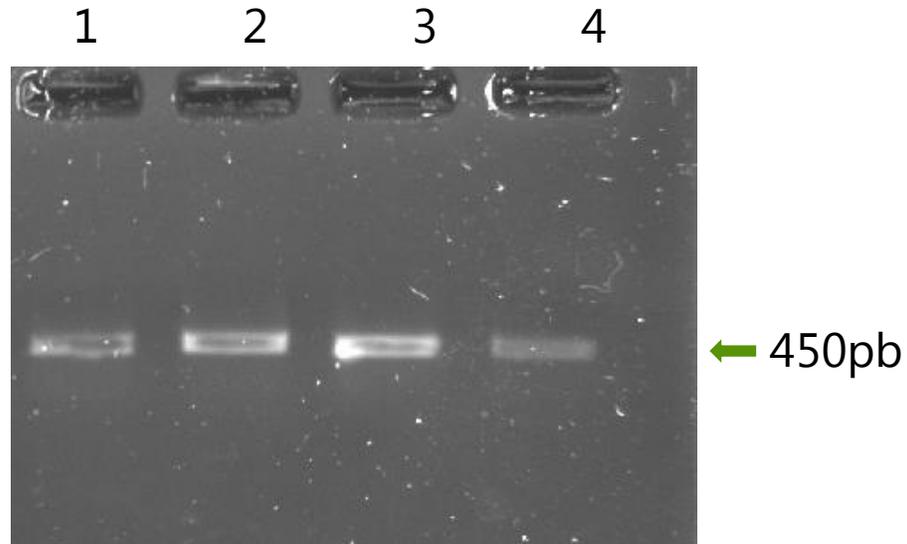


Figura 18: Análisis electroforético de la limpieza de la reacción de amplificación de un fragmento del gen ribosomal 16S de los aislados bacterianos Gram positivos filamentosos o cocobacilares obtenidos del tracto digestivo de *Oncideres albomarginata chamela*.

En la parte central de la matriz electroforética se ubican en forma de bandas los fragmentos de 450 pb puros (indicados con una flecha). Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe (BIO-RAD Laboratories). 1= 2 μ l de la PCR purificada del aislado III; 2=2 μ l de la PCR purificada del aislado VIII; 3= 2 μ l de la PCR purificada del aislado XIII; 4=2 μ l de la PCR purificada del aislado XII.

A partir de la secuenciación de los 4 productos de amplificación, se logró obtener 3 secuencias de ADN (VIII, XII y XIII) de calidad suficiente para llevar a cabo el análisis bioinformático. Las secuencias de nucleótidos resultaron:

- VIII:

```
AGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCCCTCCTGATCTCTACGCATTTCACTGCTA
CACCAGGAATTCCGCTACCCTCTACCACACTCTAGTCGTCCAGTTTCCACTGCAGTTCCCAGGTT
GAGCCCAGGGCTTTCACAACAGACTTAAACAACCACCTACGCACGCTTTACGCCAGTAATTCC
GAGTAACGCTTGCAACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTT
TGGGTACCGTCATCCCAACCAGGTATTAGCCGGCTGGATTTCTTCCCAACAAAAGGGCTTTACA
ACCCGAAGGCCTTCTTACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATTGTCCAATATTC
CCCACTGC
```

- XII

```
CTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATT
TCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGCCCGTATCGACTGCAGA
CCCGGGTAAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTACGCC
AATAATCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGC
GCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGC
CGTCATCCCTCACGCGGCGTGCCTGCATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATTCCTCCACTGC
```

◦ XIII

GACGGAACAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTGCGAATATCTACGAATTTACCTCTACA
CTCGCAGTTCCGCTGTCTCTTCCGGTCTCAAGTCTTCCAGTATCGAAGGCCATTCTGTGGTTGAG
CCACAGGCTTTCACCCCGACTTAAAAAACCGCCTACGCGCCCTTTACGCCAGTGATTCCGAG
CAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTATTCCTCC
GGTACCGTCATTATCGTCCCGGAGAAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCGTCATCACTCACGCG
GCATGGCTGGATCAGGGTTGCCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGC

Los resultados de la búsqueda en la biblioteca de *Basic Local Alignment Search Tool* del *National Center for Biotechnology Information* (BLAST NCBI) indican similitudes superiores al 99% con secuencias de otras bacterias aisladas e identificadas taxonómicamente depositadas previamente en el Genbank (Tabla 7).

Tabla 7: Clasificación taxonómica asignada por BLAST NCBI de las secuencias obtenidas

Clave	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	ID %
VIII	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	100
XII	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	100
XIII	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae	<i>Methylobacterium</i>	99.73

Estos resultados se confirmaron (Tabla 8) mediante la asignación taxonómica en la base de datos SILVA (Quast et al., 2013).

Tabla 8: Resultados de la asignación taxonómica realizada en la base de datos SILVA

Clave	Resultado del alineamiento	ID %
VIII	Bacteria;"Proteobacteria";Gammaproteobacteria; Xanthomonadales;Xanthomonadaceae; <i>Stenotrophomonas</i>	100
XII	Bacteria;"Actinobacteria";Actinobacteria;Actinobacteridae; Actinomycetales;Streptomycineae;Streptomycetaceae; <i>Streptomyces</i>	100
XIII	Bacteria;"Proteobacteria";Alphaproteobacteria;Rhizobiales; Methylobacteriaceae; <i>Methylobacterium</i>	98

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas en este estudio y de las secuencias de las especies más cercanas filogenéticamente, indica que el aislado XII asignado al género *Streptomyces*, se agrupa con la especie *Streptomyces rochei*, mientras que los aislados VIII y XIII forman un linaje independiente dentro de los géneros en los que fueron clasificados (Figura 19), es decir que presentan diferencias genéticas respecto a las secuencias de bacterias conocidas y depositadas en bases de datos públicas.

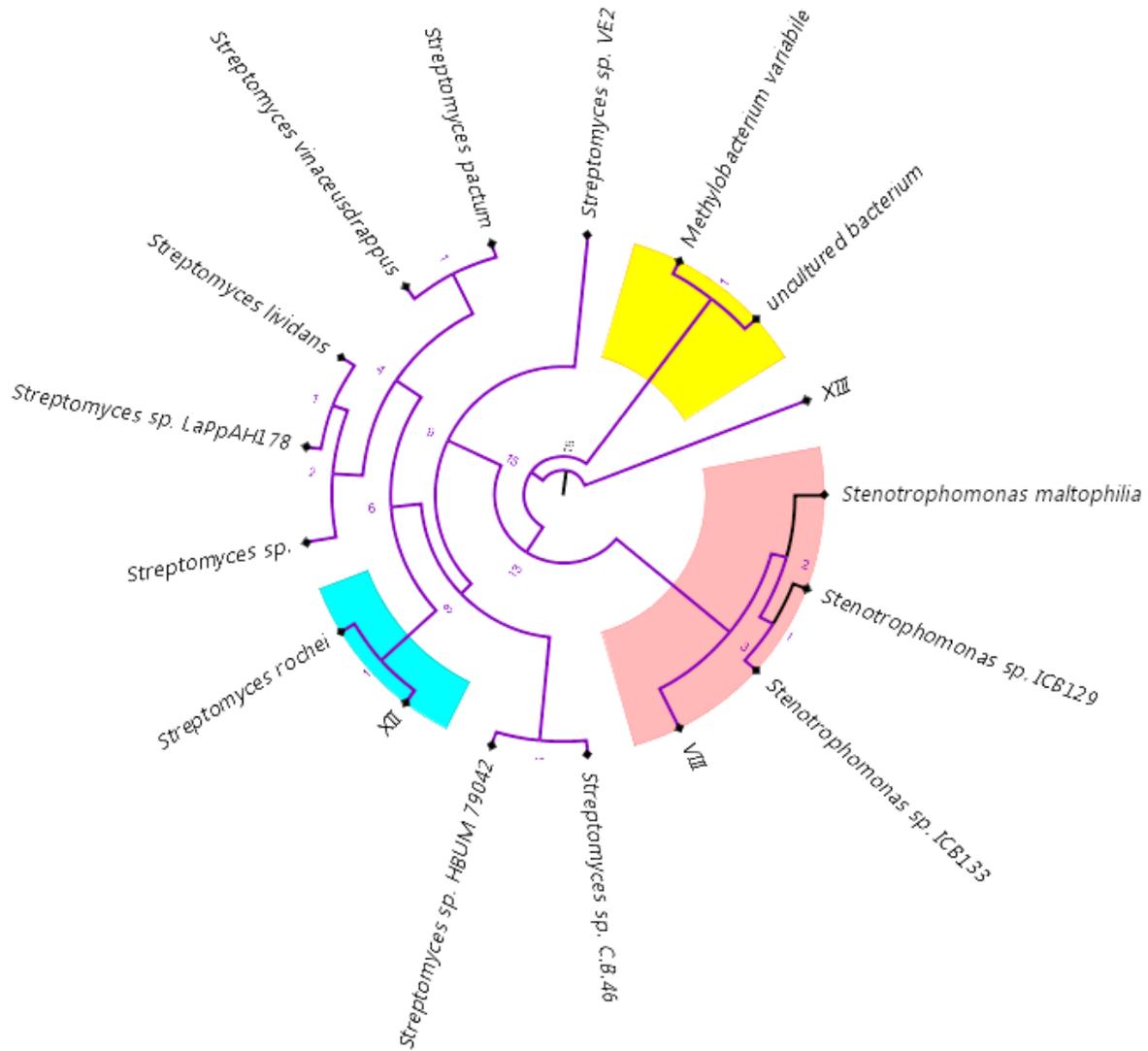


Figura 19: Árbol filogenético de los aislados bacterianos obtenidos de *Oncideres albomarginata chamela*
 Las zonas sombreadas indican la asignación por similitud de cada aislado: en amarillo al aislado VIII; en azul al aislado XII y en rosa al aislado XIII. EL árbol filogenético se editó con el programa TreeGraph_2.15.0-887_beta.

De los 3 aislados bacterianos identificados genéticamente, sólo el aislado XII (*Streptomyces* sp.) pertenece al grupo de las actinobacterias. Este aislado presenta una morfología macro y microscópica característica del grupo (Figura 21).

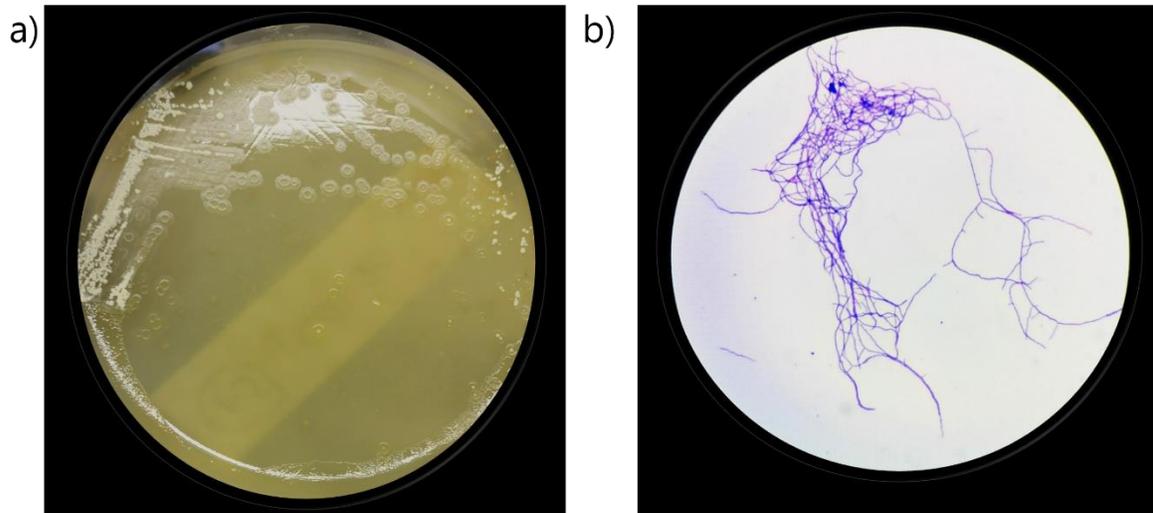


Figura 20: Morfología macro y microscópica del aislado bacteriano obtenido del tracto digestivo de *Oncideres albomarginata chamela* identificado genéticamente como *Streptomyces* sp.

a) Cultivo puro a los 7d de incubación en AIM6 realizado por estría simple; b) Tinción Gram observada a 100x.

3 Ensayos in vitro de interacciones microbianas: inhibición fúngica mediada por actinobacterias

a) De los hongos simbiotes

Los cultivos primarios puros de cada actinobacteria incubados durante 7 días a condiciones ambientales desarrollaron diferente morfología (Figura 21).

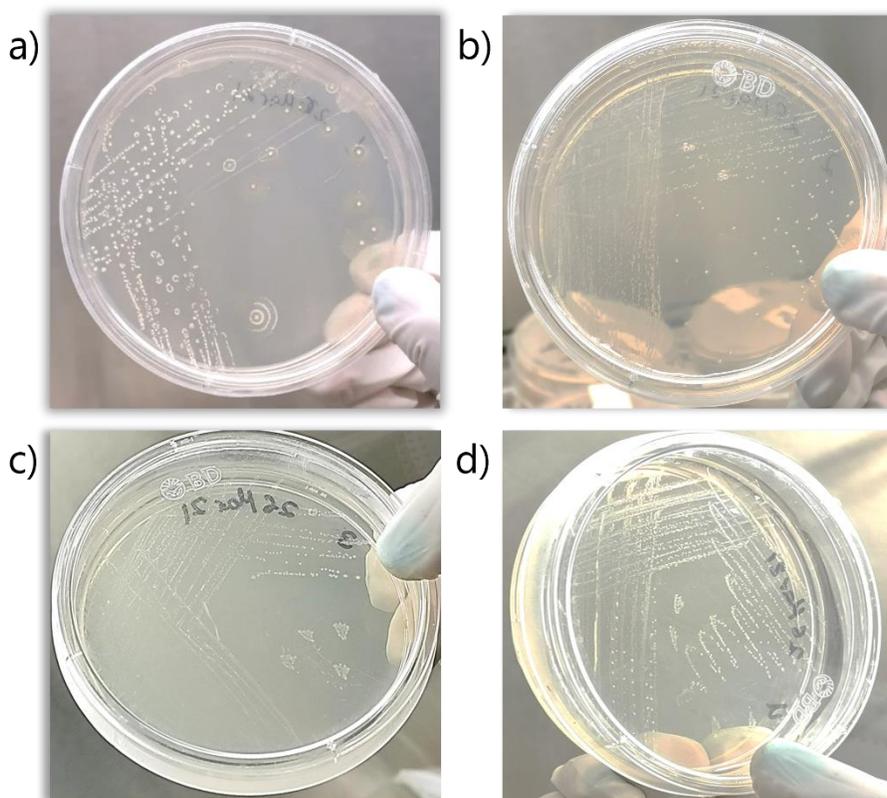


Figura 21: Crecimiento de actinobacterias a los 7 días de incubación

Inoculación por estría simple en CMC. a) *Streptomyces* sp.; b) *Pseudoarthrobacter* sp.; c) *Arthrobacter* sp.; d) *Brachybacterium* sp.

Penicillium sp.

Los ensayos de la interacción del hongo con los 4 aislados de las actinobacterias indican diferencias en el crecimiento del hongo respecto al control, tanto a los 7 días de inoculación (Figura 22) como a los 15 días (Figura 23). El control mostró un crecimiento radial uniforme mientras que en presencia de las actinobacterias el crecimiento del hongo fue irregular y disperso como consecuencia de una esporulación profusa, particularmente para los cultivos del hongo frente a *Streptomyces* sp. (Figura 23a).

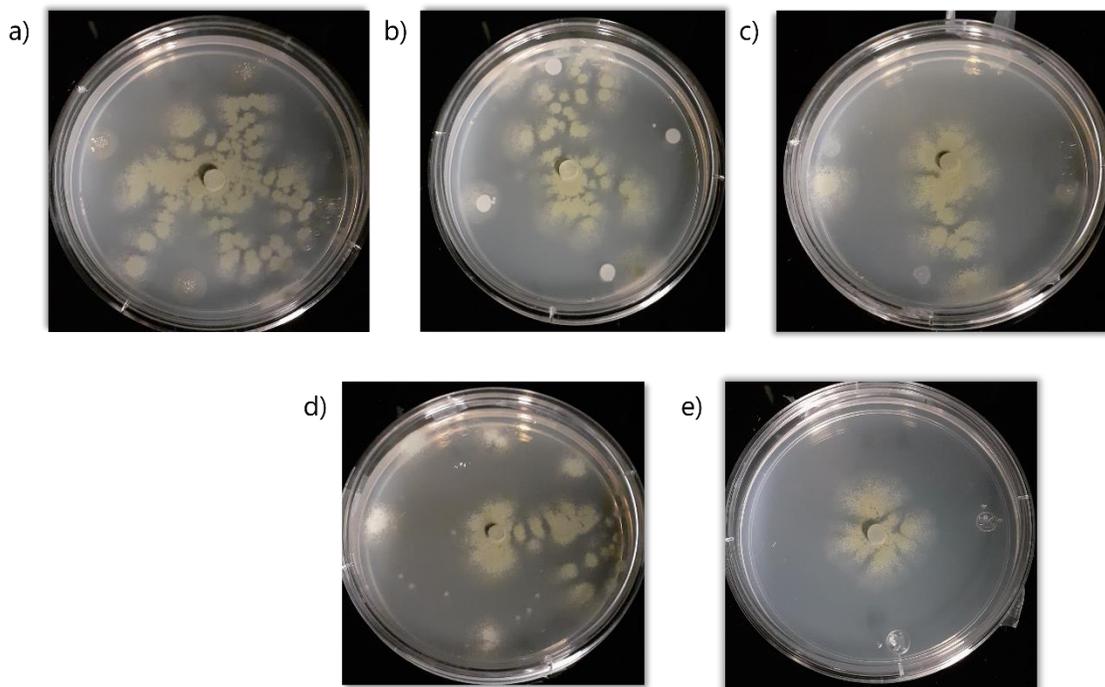


Figura 22: Ensayo de crecimiento del hongo *Penicillium* sp. frente a las actinobacterias a los 7 días de incubación

Al centro de la placa Petri se ubica un trozo del cultivo primario del hongo y a las 4 esquinas de éste 20µL del cultivo líquido de cada actinobacteria. a) *Streptomyces* sp.; b) *Pseudoarthrobacter* sp.; c) *Arthrobacter* sp.; d) *Brachybacterium* sp. e) Control negativo del hongo con el mismo tiempo de incubación. Cultivados en CMC

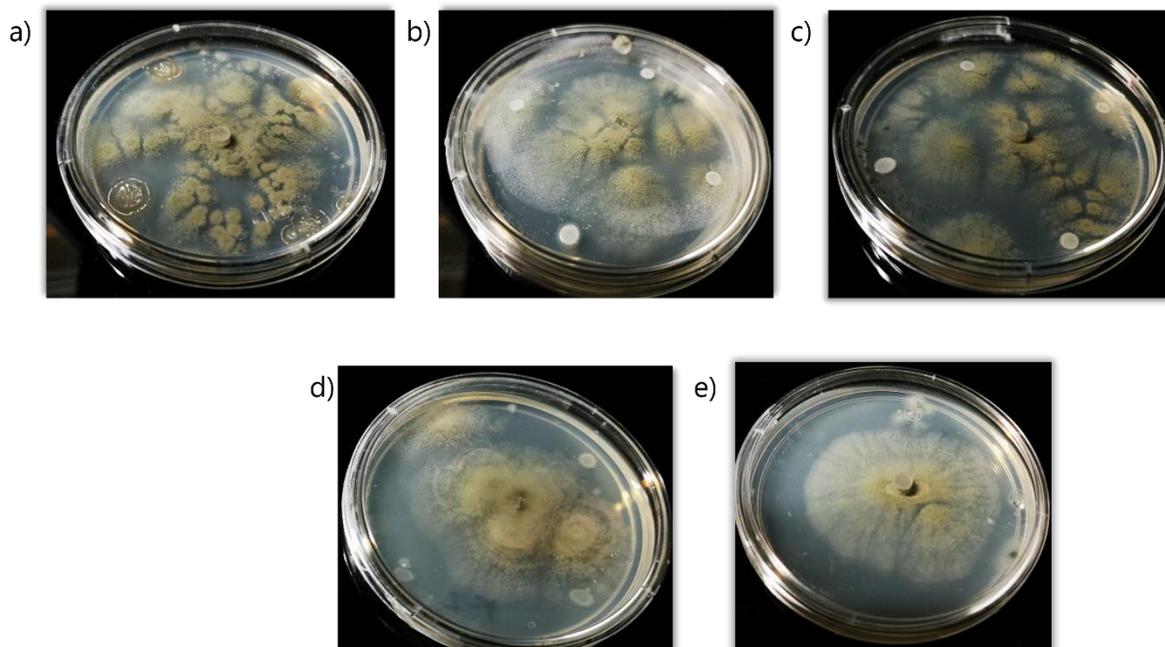


Figura 23: Ensayo de crecimiento del hongo *Penicillium* sp. frente a las actinobacterias a los 15 días de incubación

Al centro de la placa Petri se ubica un trozo del cultivo primario del hongo y a las 4 esquinas de éste 20µL del cultivo líquido de cada actinobacteria. a) *Streptomyces* sp.; b) *Pseudoarthrobacter* sp.; c) *Arthrobacter* sp.; d) *Brachybacterium* sp. e) Control negativo del hongo con el mismo tiempo de incubación. Cultivados en CMC.

Stagonospora sp.

Los ensayos de la interacción del hongo con los 4 aislados de las actinobacterias no mostraron diferencias en la forma de crecimiento del hongo respecto al control a lo largo de todo el tiempo de incubación (7, 15 y 21 días; Figura 24, 26 y 27 respectivamente). Sin embargo, el aislado bacteriano *Streptomyces* sp. indujo el menor crecimiento del hongo en el último periodo de incubación (Figura 27a).

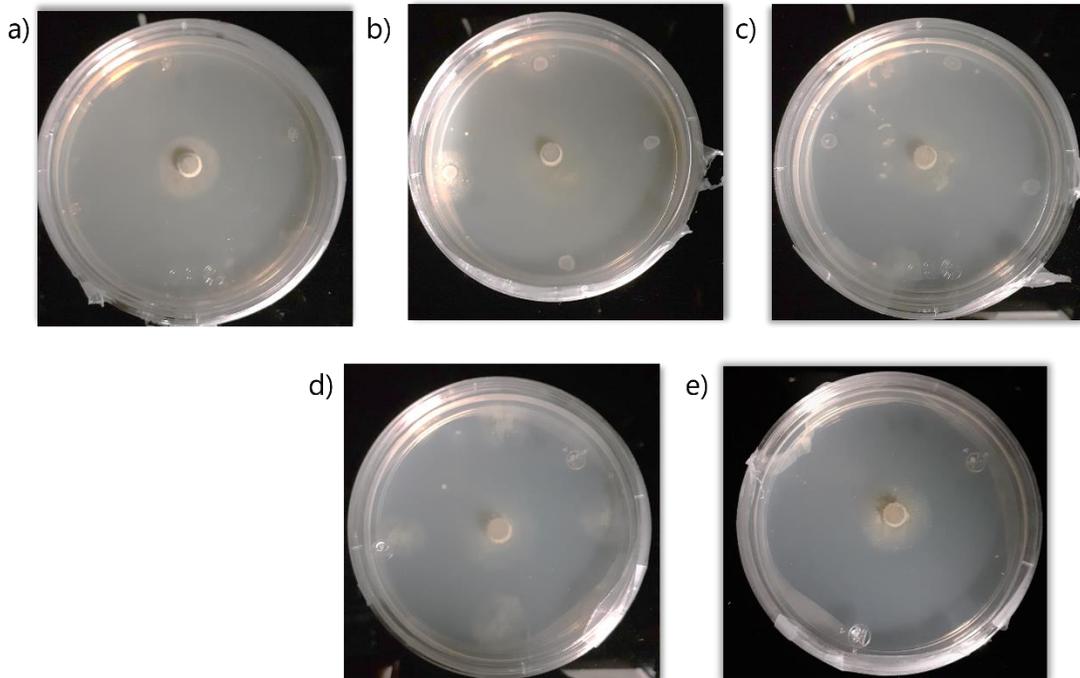


Figura 24: Ensayo de crecimiento del hongo *Stagonospora* sp. frente a las actinobacterias a los 7 días de incubación

Al centro de la placa Petri se ubica un trozo del cultivo primario del hongo y a las 4 esquinas de éste 20µL del cultivo líquido de cada actinobacteria. a) *Streptomyces* sp.; b) *Pseudoarthrobacter* sp.; c) *Arthrobacter* sp.; d) *Brachybacterium* sp. e) Control negativo del hongo con el mismo tiempo de incubación. Cultivados en CMC.

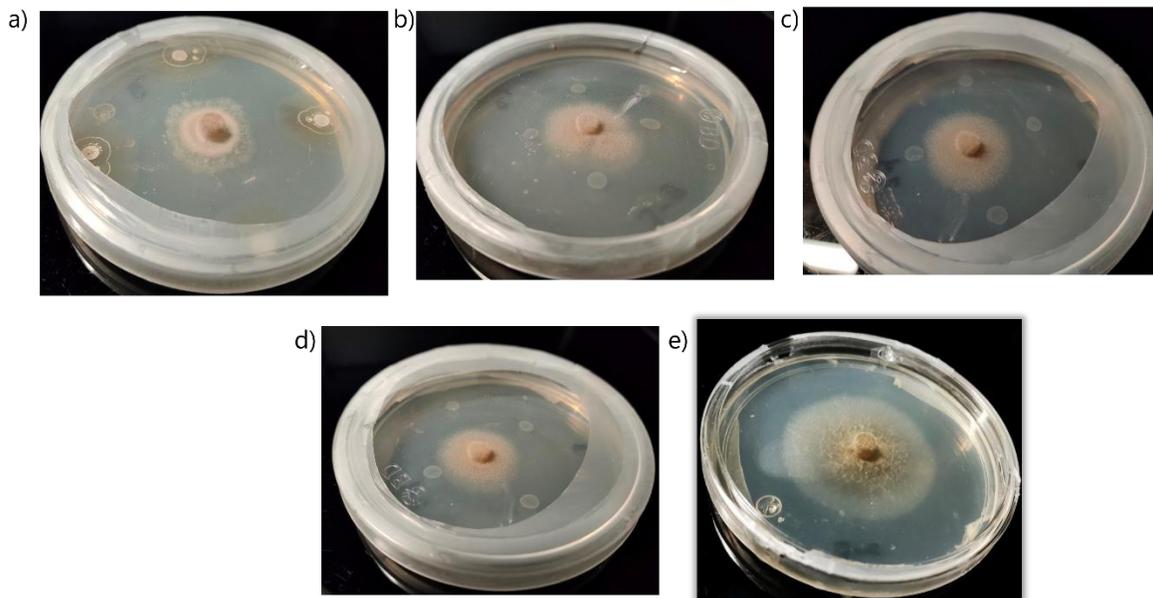


Figura 25: Ensayo de crecimiento del hongo *Stagonospora* sp. frente a las actinobacterias a los 15 días de incubación

Al centro de la placa Petri se ubica un trozo del cultivo primario del hongo y a las 4 esquinas de éste 20µL del cultivo líquido de cada actinobacteria. a) *Streptomyces* sp.; b) *Pseudoarthrobacter* sp.; c) *Arthrobacter* sp.; d) *Brachybacterium* sp. e) Control negativo del hongo con el mismo tiempo de incubación. Cultivados en CMC.

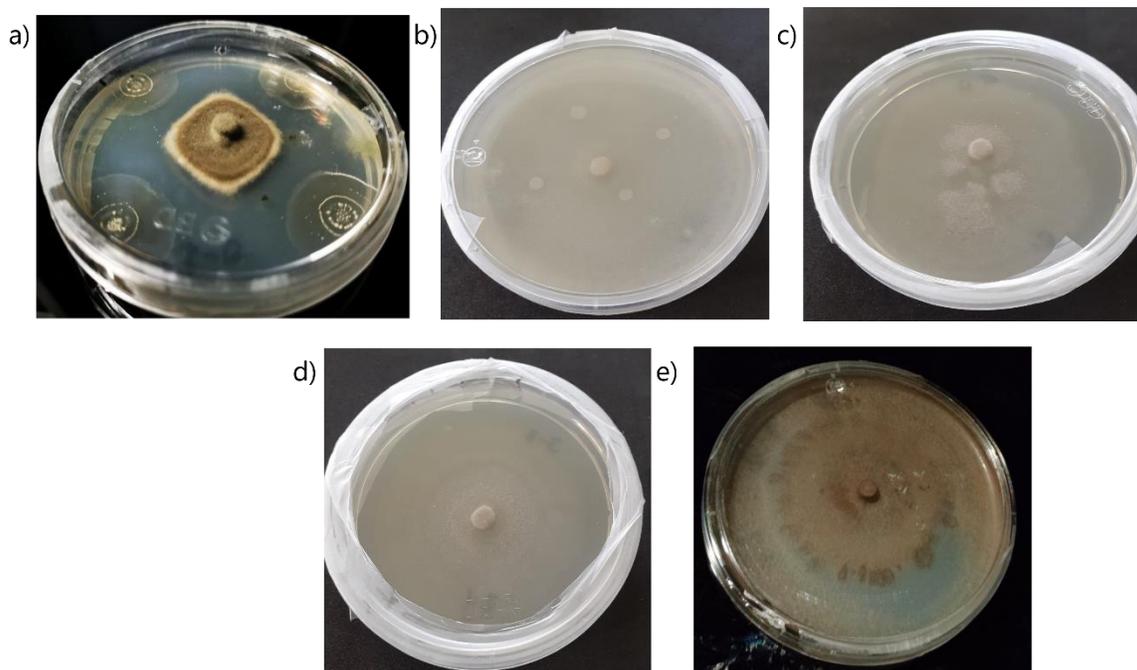


Figura 26: Ensayo de crecimiento del hongo *Stagonospora* sp. frente a las actinobacterias a los 21 días de incubación

Al centro de la placa Petri se ubica un trozo del cultivo primario del hongo y a las 4 esquinas de éste 20µL del cultivo líquido de cada actinobacteria. a) *Streptomyces* sp.; b) *Pseudoarthrobacter* sp.; c) *Arthrobacter* sp.; d) *Brachybacterium* sp. e) Control negativo del hongo con el mismo tiempo de incubación. Cultivados en CMC.

La media del área calculada, el error estándar y los datos de contraste del crecimiento de los dos hongos simbiotes, tanto los controles negativos como con los tratamientos frente a las 4 actinobacterias probadas en cada periodo de incubación se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9: Crecimiento de los hongos simbiotes frente a las actinobacterias

Hongo	Tiempo de incubación	Tratamiento	Crecimiento* y error estándar	Estadísticos del contraste	
<i>Penicillium</i> sp.	7 días	Control	8.666 ± 0.28		
		<i>Arthrobacter</i> sp.	7.11 ± 0.78	F _{1,8} = 1.62	P = 0.1104
		<i>Brachybacterium</i> sp.	7.79 ± 0.52	F _{1,8} = 7.80	P = 0.1878
		<i>Pseudoarthrobacter</i> sp.	13.78 ± 1.81	F _{1,8} = 3.50	P = 0.0315
		<i>Streptomyces</i> sp.	11.01 ± 1.82	F _{1,8} = 2.21	P = 0.2498
	15 días	Control	63.61 ± 0	F _{1,8} = 0.0	P = 0.9915
		<i>Arthrobacter</i> sp.	63.61 ± 0	F _{1,8} = 0.0	P = 0.9915
		<i>Brachybacterium</i> sp.	63.61 ± 0	F _{1,8} = 0.0	P = 0.9915
		<i>Pseudoarthrobacter</i> sp.	63.61 ± 0	F _{1,8} = 0.0	P = 0.9915
		<i>Streptomyces</i> sp.	25.152 ± 3.34	F _{1,8} = 130.94	P < 0.0001
<i>Stagonospora</i> sp.	7 días	Control	3.876 ± 0.21		
		<i>Arthrobacter</i> sp.	4.424 ± 0.77	F _{1,8} = 0.47	P = 0.5186
		<i>Brachybacterium</i> sp.	3.733 ± 0.64	F _{1,8} = 0.05	P = 0.8381
		<i>Pseudoarthrobacter</i> sp.	4.248 ± 0.42	F _{1,8} = 0.63	P = 0.4580
		<i>Streptomyces</i> sp.	2.76 ± 0.44	F _{1,8} = 5.19	P = 0.0629
	15 días	Control	5.32 ± 0.29		
		<i>Arthrobacter</i> sp.	5.98 ± 0.22	F _{1,8} = 3.20	P = 0.1278
		<i>Brachybacterium</i> sp.	5.73 ± 0.70	F _{1,8} = 0.30	P = 0.6050
		<i>Pseudoarthrobacter</i> sp.	3.655 ± 0.71	F _{1,8} = 4.71	P = 0.0730
		<i>Streptomyces</i> sp.	5.316 ± 0.11	F _{1,8} = 0.00	P = 0.9915
	21 días	Control	63.61 ± 0	F _{1,8} = 0.0	P = 0.9915
		<i>Arthrobacter</i> sp.	63.61 ± 0	F _{1,8} = 0.0	P = 0.9915
		<i>Brachybacterium</i> sp.	63.61 ± 0	F _{1,8} = 0.0	P = 0.9915
		<i>Pseudoarthrobacter</i> sp.	63.61 ± 0	F _{1,8} = 0.0	P = 0.9915
		<i>Streptomyces</i> sp.	6.92 ± 0.58	F _{1,8} = 8147.72	P < 0.0001

* Media en cm² y error estándar del crecimiento del control vs el crecimiento del hongo frente a las diferentes actinobacterias

Estos resultados indican que las cepas bacterianas *Arthrobacter* sp., *Brachybacterium* sp., y *Pseudoarthrobacter* no tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el crecimiento de los hongos *Penicillium* sp. y *Stagonospora* sp en ningún período de incubación probado, con excepción de *Brachybacterium* sp. que generó mayor crecimiento de *Penicillium* sp. a los 7 días de incubación, pero este estímulo inicial se perdió al final del ensayo (Tabla 4). Por su parte, la cepa *Streptomyces* sp. fue la única actinobacteria que, en el último período de incubación de los ensayos con cada uno de los hongos, mostró un efecto estadísticamente significativo sobre el crecimiento de ambos hongos (*Penicillium* sp. y *Stagonospora* sp.)

Específicamente, *Streptomyces* sp. mostró inhibición del crecimiento de ~56 y 38 cm² para *Stagonospora* sp. y *Penicillium* sp. respectivamente (Figura 28).

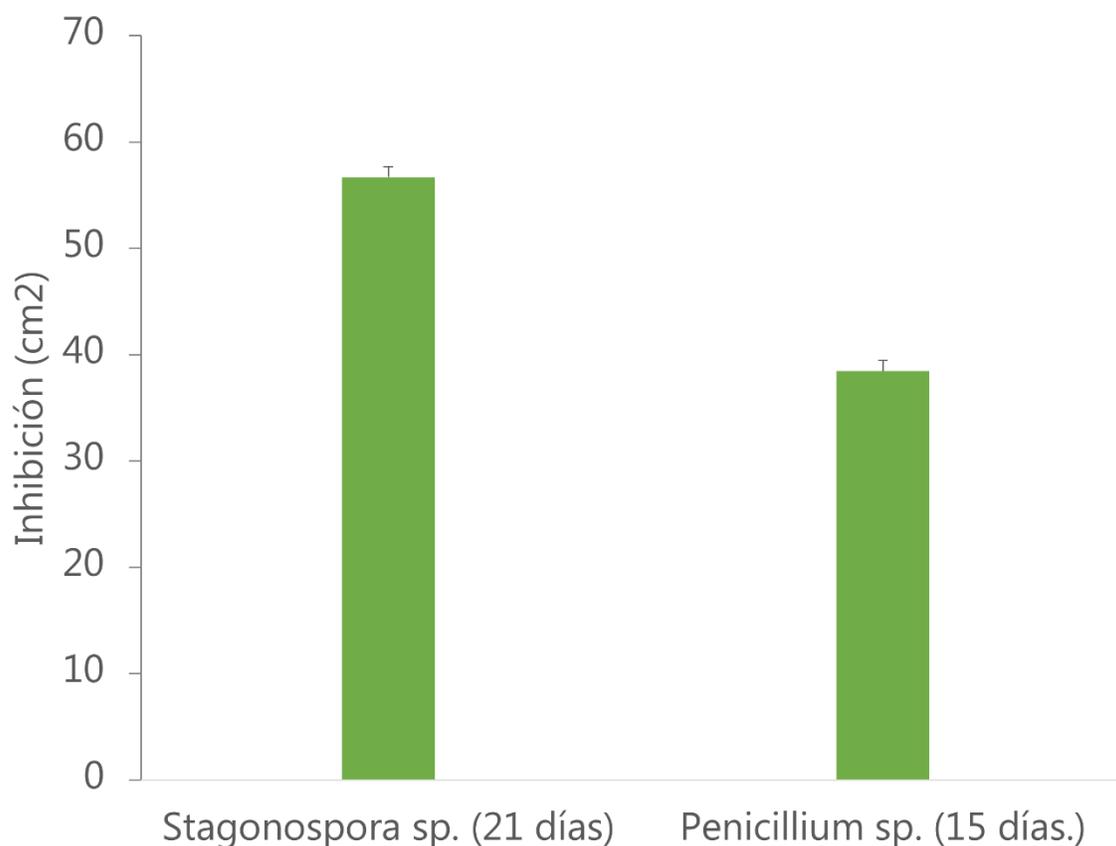


Figura 27: Inhibición mostrada por los hongos simbioses frente a *Streptomyces* sp.

Resultado de comparar el crecimiento del control vs el tratamiento. En el eje horizontal se ubica el tiempo de incubación; en el eje vertical se expresa el área de inhibición en cm².

b) De los hongos entomopatógenos

Debido al efecto de inhibición mostrado por *Streptomyces* sp., se examinó el crecimiento de esta cepa bacteriana en PDA en el cual el aislado bacteriano mostró una morfología colonial distinta a la observada en los medios AIM6 y CMC (Figura 28); tanto la elevación como el borde se volvieron irregulares y obtuvo un color marrón al reverso en PDA, característica que coincide con los miembros del género que han sido reportados previamente como productores del pigmento melanina (El-Naggar & El-Ewasy 2017; El-Naggar & Saber 2022; Samarasinghe et al. 2018; Dastager. et al 2006; Periyasamy et al., 2018).

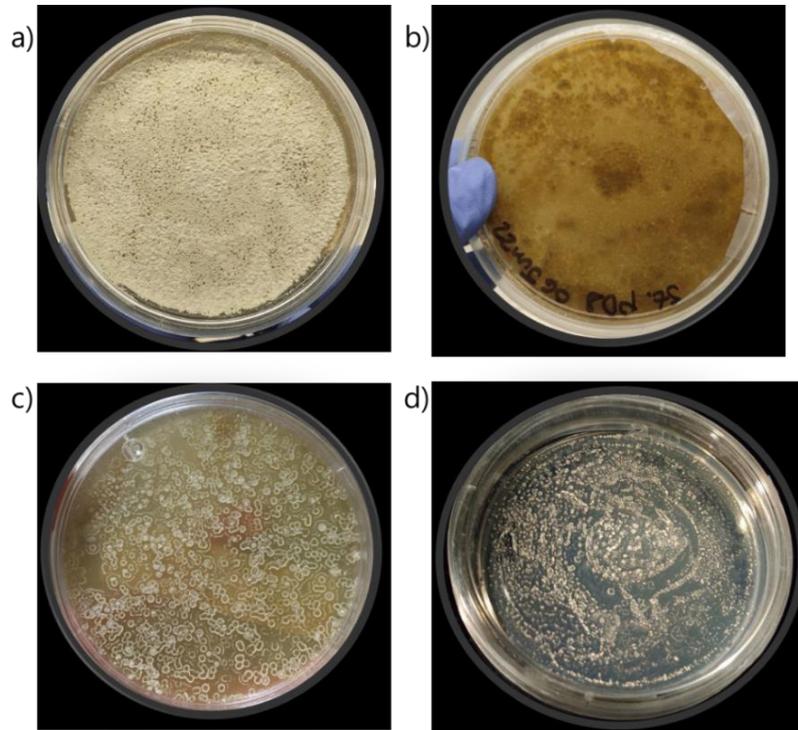


Figura 28: Crecimiento de *Streptomyces* sp. a los 7 días de incubación en diferentes medios

a)- b) Anverso y reverso en PDA; c) Anverso en AIM6 d) Anverso en CMC. Se inoculó 100 μ L de la bacteria en caldo nutritivo al centro y se extendió con asa de Digrafsky.

Beauveria bassiana

Los ensayos por cuadruplicado de la interacción sin y con ventaja de tiempo para la bacteria (I y II respectivamente) entre *Streptomyces* sp. y el hongo presentaron diferencias en el crecimiento del hongo respecto al control negativo siendo el de éste último visiblemente mayor, tanto a los 7, 15 y 21 días de incubación (Figura 29). Sin embargo, el crecimiento del hongo no mostró diferencias en el crecimiento entre los dos ensayos (con y sin ventaja de tiempo) en ningún momento del período de incubación.

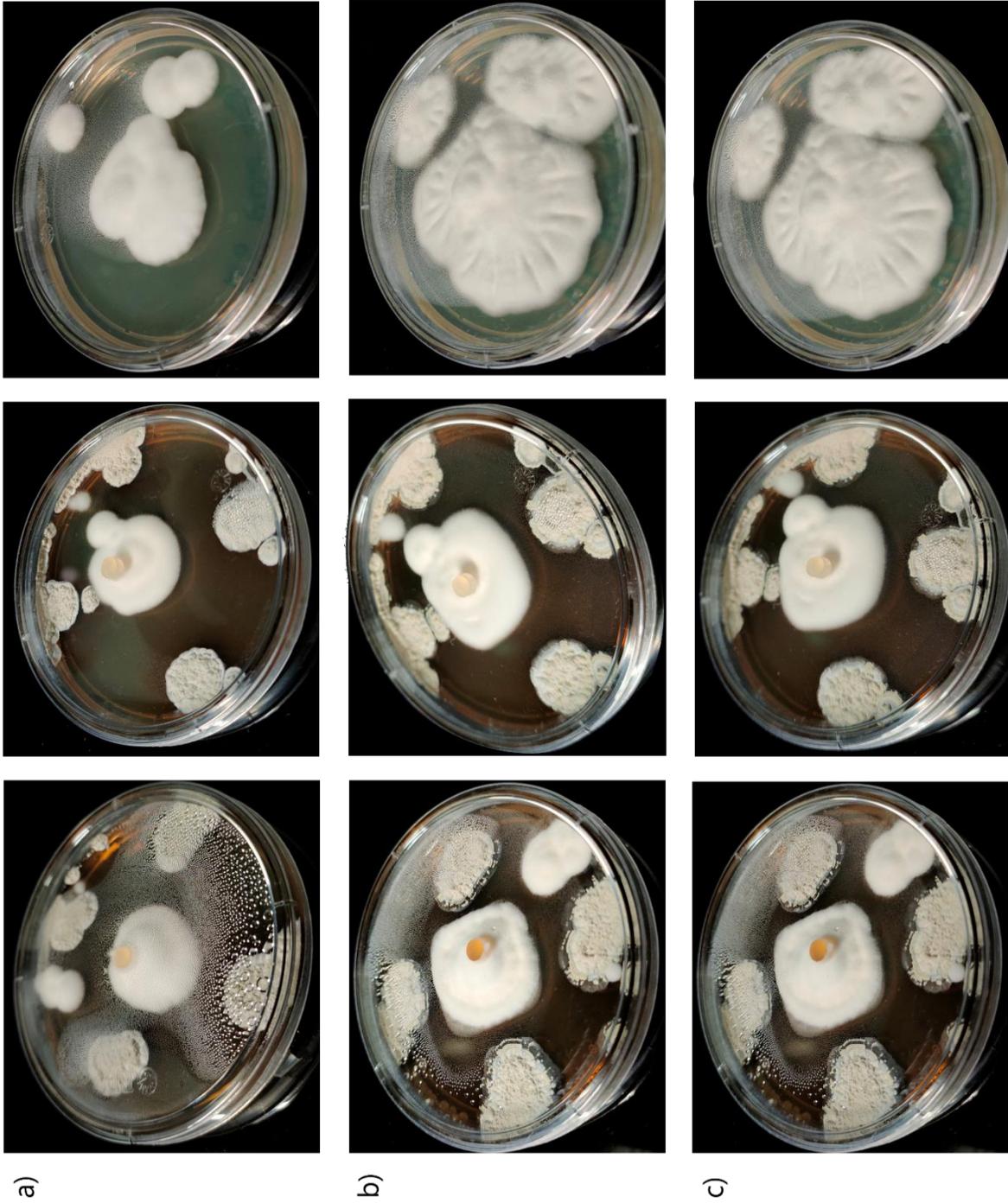


Figura 29: Ensayo de crecimiento del hongo *Beauveria bassiana* frente a *Streptomyces* sp.

Por tiempo de incubación a) 7 días, b) 15 días y c) 21 días. En la primer columna se ubican los ensayos de tipo I (inoculación simultánea); en la segunda los de tipo II (inoculación del hongo después de incubar la bacteria 7 días) y en la tercera el control negativo del hongo. Al centro de la placa Petri se ubica un trozo del cultivo primario del hongo y a las 4 esquinas de éste 20µL del cultivo líquido la bacteria. Cultivados en PDA.

En los primeros 7 días de incubación (Figura 29a) presentó un crecimiento lento, y de características morfológicas típicas de la especie tanto en presencia de la actinobacteria como en el control negativo; mientras que *Streptomyces* sp., presentó un crecimiento rápido y un cambio de coloración del medio.

A los 15 días de incubación (Figura 29b) *B. bassiana* presentó un mayor crecimiento en el control negativo, al ocupar casi la totalidad de la placa mientras que en presencia de *Streptomyces* sp. fue notablemente menor.

A los 21 días de incubación (Figura 29c) *B. bassiana* ocupó la totalidad de la placa mientras que en presencia de *Streptomyces* sp. no presentó cambios significativos respecto a los 7 días previos de incubación.

La media del área calculada, el error estándar y los datos de contraste del crecimiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, tanto el control negativo como con los tratamientos frente a las 4 actinobacterias probadas en cada periodo de incubación se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10: Crecimiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* frente a *Streptomyces* sp.

Tiempo de incubación	Crecimiento*		Estadísticos del contraste	
	Control	Tratamiento		
Ensayo tipo I				
7d	12.17± 0.28	9.75 ± 1.63	F _{1,8} = 2.14	P = 0.1939
15d	28.49± 0.64	11.54 ± 1.33	F _{1,8} = 131.44	P < 0.0001
21d	33.97± 0.74	12.95 ± 1.84	F _{1,8} = 112.04	P < 0.0001
Ensayo tipo II				
7d	12.17± 0.28	7.52 ± 0.55	F _{1,8} = 56.20	P = 0.0003
15d	28.49± 0.64	11.44± 1.17	F _{1,8} = 163.16	P < 0.0001
21d	33.97± 0.74	13.51±1.84	F _{1,8} = 99.29	P < 0.0001

*Media en cm² y error estándar del crecimiento del control vs el crecimiento del hongo frente a *Streptomyces* sp.

Estos resultados indican que *Streptomyces* sp. tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de *Beauveria* sp. a partir de los 15 días de incubación para el ensayo donde la bacteria no tuvo ventaja en crecimiento (I), y durante la duración de todo el ensayo para el caso que la bacteria tuvo ventaja en el crecimiento (II). Este efecto se clasifica como un efecto inhibitorio ya que generó una disminución en el crecimiento del hongo respecto a la comparación de los valores de inhibición entre ambos ensayos (sin y con ventaja), los resultados del análisis estadístico indican que no hay diferencia significativa entre los ensayos, es decir, el efecto de inhibición es similar en ambos ensayos (Figura 30).

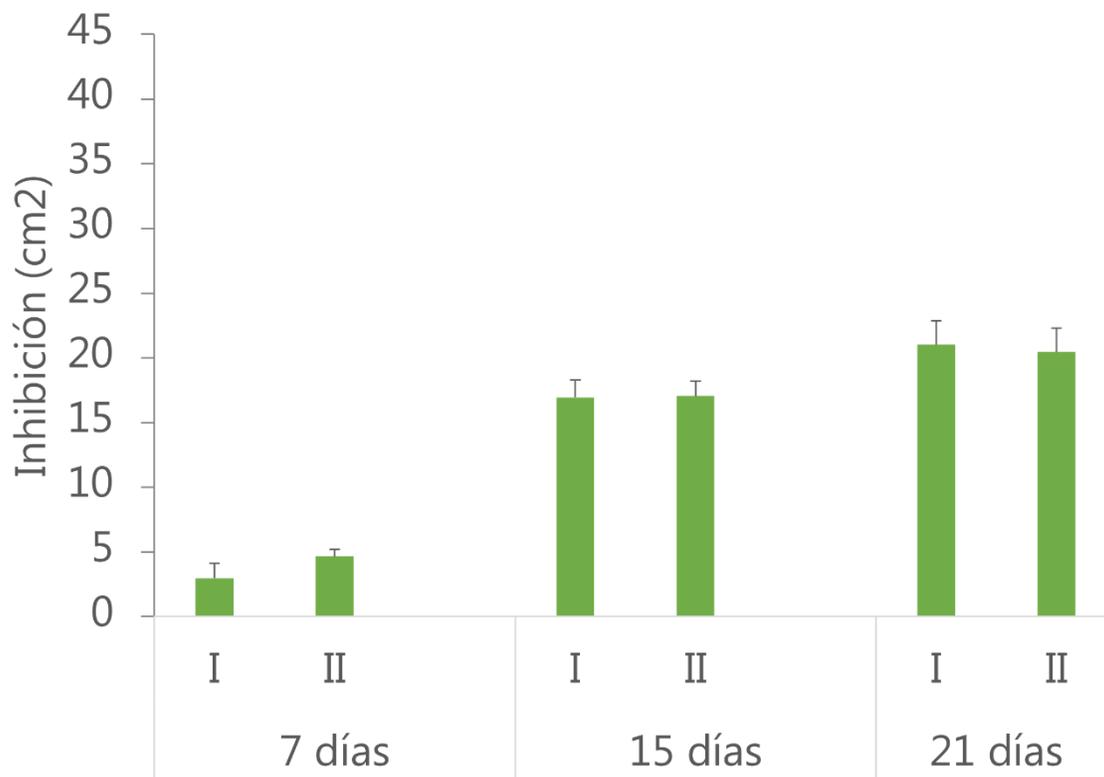


Figura 30: Inhibición mostrada por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* frente a *Streptomyces sp.*

Resultado de comparar el crecimiento del control vs el tratamiento. En el eje horizontal se ubica el tiempo de incubación en los dos tipos de ensayos (I: inoculación simultánea; II: con 7 días de ventaja de crecimiento de la actinobacteria); en el eje vertical se expresa el área de inhibición en cm².

Metarhizium anisopliae

La interacción con *Streptomyces sp.* mostró menor crecimiento del hongo en presencia de la actinobacteria respecto al control en ambas condiciones (con y sin ventaja para la bacteria; I y II respectivamente) a lo largo de todo el período de incubación, pero contrario a lo observado para *B. bassiana*, la ventaja de crecimiento de 7 días para la actinobacteria tuvo un efecto mayor sobre el crecimiento del hongo, ya que en este tratamiento el crecimiento es menor durante todo el período de incubación (Figura 31).

El micelio aéreo de *Metarhizium anisopliae* cambió de color a lo largo del período de incubación, siendo de color verde pino en los primeros 15 días de incubación (Figuras 31a y b) y verde oscuro en la tercera semana de incubación (Figura 31c), lo cual está relacionado con la esporulación (Raza et al.,2019).

En los primeros 7 días de incubación (Figura 31a) el hongo presentó características morfológicas típicas de la especie tanto en presencia de la actinobacteria como en el control negativo; sin embargo, en presencia de *Streptomyces sp.*, el crecimiento fue significativamente menor que en el control.



Figura 31: Ensayo de crecimiento del hongo *Metarhizium anisopliae* frente a *Streptomyces* sp.

Por tiempo de incubación a) 7 días, b) 15 días y c) 21 días. En la primer columna se ubican los ensayos de tipo I (inoculación simultánea); en la segunda los de tipo II (inoculación del hongo después de incubar la bacteria 7 días) y en la tercera el control negativo del hongo. Al centro de la placa Petri se ubica un trozo del cultivo primario del hongo y a las 4 esquinas de éste 20µL del cultivo líquido la bacteria. Cultivados en PDA.

A los 15 días de incubación (Figura 31b) *M. anisopliae* ocupó casi la totalidad de la placa; mientras que en presencia de *Streptomyces* sp., el crecimiento fue significativamente menor especialmente en el modelo de ensayo II (con ventaja de 7 días de crecimiento para la actinobacteria), en donde no sólo se vio limitado el crecimiento sino también ocurrió el cambio de tonalidad del micelio aéreo; no observado en el modelo de ensayo I (sin ventaja de crecimiento).

Al cumplir los 21 días de incubación (Figura 31c) el micelio aéreo de *M. anisopliae* cambió de tonalidad tanto en el control negativo como en el modelo de ensayo I (sin ventaja de crecimiento). El crecimiento del control negativo ocupó la totalidad de la placa mientras que en presencia de *Streptomyces* sp. fue visiblemente similar al de los 15 días de incubación en ambos modelos de ensayo.

El análisis estadístico del crecimiento de *M. anisopliae* frente a *Streptomyces* sp. al igual que para *B. bassiana* indica que la actinobacteria tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento del hongo a partir de los 15 días de incubación para el ensayo I (sin ventaja) y durante todo el tiempo de incubación para el ensayo II (con ventaja), mostrando efectos de inhibición (Tabla 11).

Tabla 11: Crecimiento del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* frente a *Streptomyces* sp.

Tiempo de incubación	Crecimiento*		Estadísticos del contraste	
	Control	Tratamiento		
Ensayo tipo I				
7d	21.34± 4.76	12.31 ± 2.55	$F_{1,8} = 2.79$	$P = 0.1456$
15d	40.31± 1.08	16.03 ± 2.08	$F_{1,8} = 107.61$	$P < 0.0001$
21d	48.891±1.71	18.04 ± 2.58	$F_{1,8} = 112.04$	$P < 0.0001$
Ensayo tipo II				
7d	21.34± 4.76	5.412± 1.49	$F_{1,8} = 10.19$	$P = 0.0188$
15d	40.31± 1.08	6.92± 1.07	$F_{1,8} = 481.34$	$P < 0.0001$
21d	48.891±1.71	8.169±0.74	$F_{1,8} = 478.13$	$P < 0.0001$

*Media en cm² y error estándar del crecimiento del control vs el crecimiento del hongo frente a *Streptomyces* sp.

Sin embargo, la comparación de resultados de ambos ensayos (sin y con ventaja), indican que en este caso la inhibición del crecimiento del hongo *M. anisopliae* fue significativamente mayor por el ensayo II a partir de los 15 días de incubación (Figura 32).

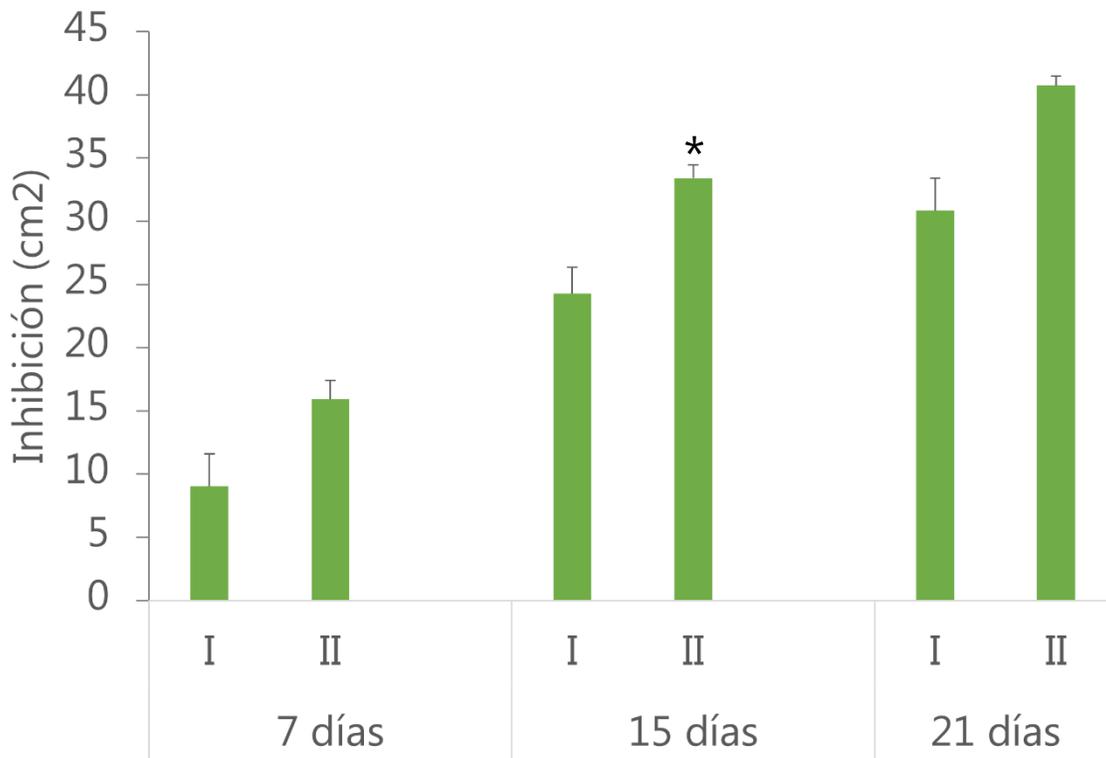


Figura 32: Inhibición mostrada por el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* frente a *Streptomyces sp.*

Resultado de comparar el crecimiento del control vs el tratamiento de manera independiente para cada uno de los periodos de incubación. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.0001$). En el eje horizontal se ubica el tiempo de incubación en los dos tipos de ensayos (I: inoculación simultánea; II: con 7 días de ventaja de crecimiento de la actinobacteria); en el eje vertical se expresa el área de inhibición en cm^2 .

VII. Discusión

La simbiosis bacteriana alguna vez se consideró un fenómeno raro, pero cada vez más se entiende como un aspecto omnipresente en la vida de los insectos (O'Brien & Wright, 2011). Uno de los grupos bacterianos mayormente representados en la microbiota intestinal de los insectos es el de las actinobacterias que contienen numerosos conjuntos de genes biosintéticos (BGC) codificadores de enzimas capaces de participar en la degradación de sustratos de plantas y hongos, en el suministro de nutrientes esenciales, en la regulación de la respuesta inmune y en la detoxificación de compuestos; así como también contribuyen en la protección contra depredadores y patógenos a través de la producción de agentes antimicrobianos (Murphy et al., 2021). En el presente proyecto se propuso aislar (mediante un medio de cultivo selectivo) e identificar por métodos moleculares que utilizan marcadores universales, las actinobacterias presentes en el tracto digestivo y en las excretas del escarabajo barrenador *Oncideres albomarginata chamela* para después analizar los tipos de interacciones insecto-actinobacterias que tienen lugar en el tracto digestivo y su posible efecto protector ante infecciones fúngicas.

De los 14 cultivos puros extraídos 4 mostraron morfología típica de actinobacterias al observarlas al microscopio: cocobacilos o filamentos Gram positivos. La amplificación del gen ribosomal 16S de 3 de los 4 aislados fue de calidad suficiente para identificarlos al nivel de género mediante la asignación taxonómica en la base de datos SILVA (Quast et al., 2013), resultando en la identificación de cepas de los géneros: *Stenotrophomonas* sp., *Methylobacterium* sp., y *Streptomyces* sp. con un porcentaje de identidad de 100, 99.73 y 100 respectivamente; siendo la última la única que pertenece al grupo de las actinobacterias.

Stenotrophomonas sp. aislada de las excretas, es una bacteria Gram negativa o Gram variable (Sipriyadi et al., 2020) que ha sido encontrada previamente en microbiomas de la saliva de algunos insectos, en el intestino medio de la garrapata *Dermaacentor silvarum* (Duan et al., 2020), y en el intestino de la mosca *Stomoxys calcitrans*, para la cual se ha sugerido una función protectora ante hongos entomopatógenos (Moraes et al., 2014). Sin embargo, no se ha reportado en microbiomas de escarabajos barrenadores, por lo cual se desconoce si su presencia en excretas de estos insectos es una colonización incidental a partir del ambiente al que están expuestas las excretas o si forma parte de los microorganismos que comúnmente colonizan las excretas proveyendo una función de protección importante para las larvas en desarrollo, ya que estas se desarrollan en las mismas cavidades donde las excretas y las fibras de madera no consumidas son depositadas, creando un ambiente propenso para el establecimiento de microorganismos potencialmente patogénicos para las larvas (Calderón-Cortés et al., 2011). El análisis filogenético del presente estudio reveló una cercanía del aislado bacteriano con la especie *Stenotrophomonas maltophilia* considerada como uno de los organismos resistentes a múltiples fármacos (MROs), (Brooke, 2012); entre ellos incluido el ácido nalidíxico empleado

en el medio de cultivo para el aislamiento primario de las actinobacterias (Adegoke et al., 2017; Liaw et al., 2010; McKay et al., 2003).

El aislado identificado como *Methylobacterium* sp., es clasificado como α -proteobacteria; metilótrofo facultativo capaz de oxidar el metanol, y Gram variable (Green & Ardley, 2018) que generalmente presenta una pigmentación rosada debido a la síntesis de carotenoides, coloniza diferentes hábitats, como el suelo, el agua, los sedimentos y diferentes plantas. (Dourado et al., 2015; Furuhashi et al., 2006). Se ha reportado como resistente al cloro (Furuhashi et al., 2011) y a la radiación UV (Oguma et al., 2018). Se sabe que miembros del género *Methylobacterium* tienen relaciones mutualistas con algunas plantas (Sánchez-López et al., 2018) y están involucrados en la formación de la comunidad en la filósfera (la región aérea de la planta colonizada por microbios) (Dourado et al., 2015), sin embargo, se han aislado de la microbiota intestinal de algunas moscas como *Lutzomyia evans* (Vivero et al., 2019), *Phlebotomus* spp. (Papadopoulos et al., 2020), *Lutzomyia longipalpis* y de la chinche *Cimex lectularius* (Meriweather et al., 2013). No obstante, en el estudio de Vivero et al., (2019) se sugiere que la ingesta constante de plantas por los especímenes colectados permite la entrada de *Methylobacterium* hasta el intestino y es capaz de permanecer en él; lo cual sugiere que el aislado identificado como *Methylobacterium* sp. podría representar un residente temporal en el tracto digestivo de *O. albomarginata chamela*.

En lo que respecta a las actinobacterias, nuestros resultados indican que *Streptomyces* sp., miembro de la microbiota intestinal de *O. albomarginata chamela*, contrario a lo que se esperaba, presenta un efecto competitivo *in vitro* tanto con los hongos simbioses examinados *Stagonospora* sp. y *Penicillium* sp.; como con los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Los efectos de inhibición del crecimiento fueron mayores para *Stagonospora* sp. (~56 cm²) y *Metarhizium anisopliae* (~40 cm²), particularmente en el tipo de ensayo donde la actinobacteria tuvo 7 días previos de incubación y presentó mayor crecimiento; lo cual sugiere una mayor capacidad de secreción del compuesto antifúngico. Por el contrario, el resto de los géneros de actinobacterias ensayados *Brachybacterium* sp., *Pseudoarthrobacter* sp. y *Arthrobacter* sp. no mostraron actividad antifúngica ante los simbioses *Penicillium* sp. y *Stagonospora* sp. por lo tanto, fueron descartados para las pruebas con los hongos entomopatógenos.

Estudios previos han demostrado el potencial antibiótico de *Streptomyces* sp. (Al Raish et al., 2021; Book et al., 2016; Chevrette et al., 2019, 2020; Jose et al., 2021; Kim et al., 2016; Quinn et al., 2020; van Bergeijk et al., 2020; Zhou et al., 2021), en los cuales se ha argumentado que las actinobacterias del género *Streptomyces* son comúnmente aisladas de insectos y éstas presentan una mayor actividad antimicrobiana en comparación con las actinobacterias halladas en el suelo o las plantas.

En los insectos, aun cuando representan solo un pequeño porcentaje de la microbiota intestinal, las actinobacterias son fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis que involucra la regulación del crecimiento tanto de otros microorganismos simbioses

(Binda et al., 2018), como de aquellos que puedan resultar dañinos para el insecto anfitrión, evidenciado en los estudios de Al Raish et al., (2021) en el que exploraron el posible uso de actinobacterias aisladas del suelo como agentes de biocontrol contra el hongo fitopatógeno *Neoscytalidium dimidiatum*, demostrando que tres cepas de *Streptomyces* (*S. rochei*, *S. coelicoflavus* y *S. antibioticus*) exhiben una poderosa actividad antifúngica *in vitro*, y proponen un posible mecanismo de acción de inhibición del crecimiento asociado a la producción de enzimas degradadoras de la pared celular, metabolitos antifúngicos y/o por competencia.

Sin embargo, fueron Chevrette et al., (2019) quienes exploraron diferentes especies de *Streptomyces* asociados a microbiomas a través del muestreo de 2561 insectos que abarcan 15 órdenes taxonómicos y evidenciaron que la actividad inhibitoria es significativamente mayor hacia hongos, bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas, en comparación con los aislados de *Streptomyces* asociados a plantas. Específicamente, las cepas de *Streptomyces* provenientes de insectos tenían una actividad antifúngica significativa. También probaron que las cepas asociadas a insectos tienen una mayor bioactividad contra los patógenos de relevancia clínica *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. En otro estudio, realizado por Zhou et al., (2020) se demostró que la bacteria *Streptomyces davaonensis* aislada de la termita *Odontotermes formosanus* produce el antibiótico Roseoflavina y éste presenta una inhibición *in vitro* ante tres bacterias de interés médico *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y el estafilococo resistente a la meticilina (MRSA). Adicionalmente, en los ensayos realizados por Grubbs et al. (2021) encontraron una cepa de *Streptomyces* aislada del polen que exhibe una actividad inhibitoria contra *Paenibacillus larvae* (una bacteria entomopatígena Gram positiva) y sugieren que las abejas melíferas pueden usar actinobacterias y sus metabolitos para mediar la salud de sus colonias.

Todo lo planteado hasta ahora nos permite sugerir que *Streptomyces* sp. desempeña un papel clave en la estructura del microbioma del intestino de *O. albomarginata chamela* y probablemente un papel protector contra los hongos patógenos. En cierto sentido clasificar a los microorganismos simbioses exclusivamente como benéficos, inofensivos o nocivos resulta una tarea compleja dado que su impacto neto sobre el insecto anfitrión varía a través del continuo competencia-mutualismo. Todavía tenemos una visión limitada de la distribución y relevancia de la simbiosis bacteriana, algunos insectos probablemente no dependen en absoluto de ella. En algunos estudios, la eliminación experimental de la microbiota intestinal no produce ningún efecto, o incluso tiene un efecto positivo (Prado et al., 2006; Visotto et al., 2009; Engel & Moran, 2013; Douglas, 2007). No obstante, la versatilidad metabólica inigualable que poseen las actinobacterias, establece y mantiene una fusión inseparable entre éstas y su insecto anfitrión (Kneip et al., 2007; van Bergeijk et al., 2020).

Las investigaciones sobre las comunidades bacterianas de insectos nos permiten comprender mejor los sistemas naturales en general y predecir futuras interacciones, ya que son la principal fuerza impulsora de la innovación evolutiva al conferir nuevos rasgos fenotípicos a los insectos que les permite la colonización de un nuevo nicho ecológico. Así mismo, ofrecen nuevas estrategias para mejorar los métodos de manejo integrado de plagas (Mereghetti et al., 2017; Brummel et al., 2004). Sin embargo, hay pocos estudios sobre sustancias bioactivas de la simbiosis de insectos (Zhou et al., 2021). La extrema biodiversidad de los insectos presenta un potencial sin explotar para el descubrimiento de nuevos fármacos antimicrobianos de sus comunidades endosimbióticas (Chevrette et al., 2019).

VIII. Conclusiones

- El aislamiento e identificación de las proteobacterias *Methylobacterium* sp. y *Stenotrophomonas* sp., y de la actinobacteria *Streptomyces* sp. representa una asociación de éstas al tracto digestivo y excretas del escarabajo barrenador *Oncideres albomarginata chamela*.
- Los ensayos de las interacciones entre algunos miembros que conforman el microbioma intestinal de *O. albomarginata chamela*: las actinobacterias *Streptomyces* sp., *Pseudoarthrobacter* sp., *Arthrobacter* sp. y *Brachybacterium* sp. frente a los hongos *Penicillium* sp. y *Stagonospora* sp. reflejaron, a través de una inhibición de crecimiento de los dos géneros fúngicos probados, que *Streptomyces* sp. es el único género bacteriano involucrado en una relación de naturaleza competitiva.
- Los ensayos de las interacciones entre *Streptomyces* sp. y los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* mostraron que la actinobacteria puede inhibir el crecimiento de los hongos *in vitro*.
- La inhibición máxima provocada por *Streptomyces* sp. en el crecimiento de los hongos simbioses *Stagonospora* sp. y *Penicillium* sp. fue de ~56 y 38 cm² respectivamente, mientras que para los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* fue de ~20 y 40 cm² respectivamente.
- *Streptomyces* sp. es una actinobacteria que podría regular la estructura del microbioma intestinal de *O. albomarginata chamela*.
- *Streptomyces* sp. posiblemente confiere a su insecto anfitrión un efecto protector ante infecciones fúngicas.
- Las especies del género *Streptomyces* sp. aisladas de microbiomas de insectos representan una fuente inexplorada en la búsqueda de compuestos bioactivos útiles para áreas como el manejo de plagas y el desarrollo de fármacos antimicrobianos.

IX. Perspectivas

- A través de la evaluación de más individuos es necesario confirmar si las cepas bacterianas identificadas son residentes del tracto digestivo o de las excretas de *O. albomarginata chamela*, según corresponda, para estimar el alcance de estas interacciones.
- Tipificar los compuestos antibióticos producidos por *Streptomyces* sp. para determinar sus posibles usos biotecnológicos.
- Mediante la caracterización metabólica, morfológica y análisis filogenéticos de mayor profundidad definir si el aislado identificado como *Streptomyces* sp. es una especie nueva.
- Investigar las interacciones existentes entre distintas combinaciones de los microorganismos presentes en el microbioma.
- Demostrar si *Stenotrophomonas* sp. confiere a las larvas en desarrollo de *O. albomarginata chamela* una función protectora ante infecciones.

X. Bibliografía

Abdel-Razek, A. S., El-Naggar, M. E., Allam, A., Morsy, O. M., & Othman, S. I. (2020). Microbial Natural Products in Drug Discovery. *Processes*, 8, 470.

Acuña-González, A. (2009). Estudio de la diversidad de hongos y bacterias asociados al intestino de larvas de coleópteros y determinación de sus propiedades lignocelulíticas.

Adams, A. S., Aylward, F. O., Adams, S. M., Erbilgin, N., Aukema, B. H., Currie, C. R., ... Raffa, K. F. (2013). Mountain Pine Beetles Colonizing Historical and Naïve Host Trees Are Associated with a Bacterial Community Highly Enriched in Genes Contributing to Terpene Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 3468–3475.

Adegoke, A. A., Stenström, T. A., & Okoh, A. I. (2017). *Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy. *Frontiers in Microbiology*, 8.

Agamennone, V., Roelofs, D., van Straalen, N. M., & Janssens, T. K. S. (2018). Antimicrobial activity in culturable gut microbial communities of springtails. *Journal of Applied Microbiology*, 125, 740–752.

Al Raish, S. M., Saeed, E. E., Alyafei, D. M., El-Tarabily, K. A., & AbuQamar, S. F. (2021). Evaluation of streptomycete actinobacterial isolates as biocontrol agents against royal poinciana stem canker disease caused by the fungal pathogen *Neoscytalidium dimidiatum*. *Biological Control*, 164, 104783.

Alotaibi, S. S., Darwish, H., Zaynab, M., Alharthi, S., Alghamdi, A., Al-Barty, A., ... Noureldeen, A. (2022). Isolation, Identification, and Biocontrol Potential of Entomopathogenic Nematodes and Associated Bacteria against *Virachola livia* (Lepidoptera: Lycaenidae) and *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biology*, 11, 295.

Amoli, R. I., Nowroozi, J., Sabokbar, A., & Rajabniya, R. (2017). Isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from clinical samples: An investigation of patterns motility and production of melanin pigment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7, 826–830.

Andersson, S. G., & Kurland, C. G. (1998). Reductive evolution of resident genomes. *Trends in Microbiology*, 6, 263–268.

Anslan, S., Bahram, M., & Tedersoo, L. (2016). Temporal changes in fungal communities associated with guts and appendages of Collembola as based on culturing and high-throughput sequencing. *Soil Biology and Biochemistry*, 152–159.

Antoniewicz, M. R. (2020). A guide to deciphering microbial interactions and metabolic fluxes in microbiome communities. *Current Opinion in Biotechnology*, 64, 230–237.

Antoraz, S., Santamaría, R. I., Díaz, M., Sanz, D., & Rodríguez, H. (2015). Toward a new focus in antibiotic and drug discovery from the *Streptomyces* arsenal. *Frontiers in Microbiology*, 1 - 8.

Arango, R. A., Carlson, C. M., Currie, C. R., McDonald, B. R., Book, A. J., Green, F., ... Raffa, K. F. (2016). Antimicrobial Activity of Actinobacteria Isolated From the Guts of Subterranean Termites. *Environmental Entomology*, 45, 1415–1423.

Arocha-Garza, H. F., Canales-Del Castillo, R., Eguiarte, L. E., Souza, V., & De la Torre-Zavala, S. (2017). High diversity and suggested endemism of culturable Actinobacteria in an extremely oligotrophic desert oasis. *PeerJ*, 5, e3247.

Arrebola, E., Jacobs, R., & Korsten, L. (2010). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 386–395.

Arsène-Ploetze, F., Chiboub, O., Lièvreumont, D., Farasin, J., Freel, K. C., Fouteau, S., & Barbe, V. (2018). Adaptation in toxic environments: Comparative genomics of loci carrying antibiotic resistance genes derived from acid mine drainage waters. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 1470–1483.

Austin, B., & Goodfellow, M. (1979). *Pseudomonas mesophilica*, a new species of pink bacteria isolated from leaf surfaces. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 29.

Austin, B., Goodfellow, M., & Dickinson, C. H. (1978). Numerical taxonomy of phylloplane bacteria isolated from *Lolium perenne*. *J. Gen. Microbiology*, 104.

Balakrishnan, B., Wu, H., Cao, L., Zhang, Y., Li, W., & Han, R. (2021). Immune Response and Hemolymph Microbiota of *Apis mellifera* and *Apis cerana* After the Challenge With Recombinant *Varroa* Toxic Protein. *Journal of Economic Entomology*, 114, 1310–1320.

Baleba, S. B. S., Agbessenou, A., Getahun, M. N., Akutse, K. S., Subramanian, S., & Masiga, D. (2021). Infection of the Stable Fly, *Stomoxys calcitrans*, L. 1758 (Diptera: Muscidae) by the Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) Negatively Affects Its Survival, Feeding Propensity, Fecundity, Fertility, and Fitness Parameters. *Frontiers in Fungal Biology*, 2.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71–79.

Barea, null, Andrade, null, Bianciotto, null, Dowling, null, Lohrke, null, Bonfante, null, ... Azcon-Aguilar, null. (1998). Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2304–2307.

Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., ... van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 80, 1–43.

Bar-Shmuel, N., Behar, A., & Segoli, M. (2020). What do we know about biological nitrogen fixation in insects? Evidence and implications for the insect and the ecosystem. *Insect Science*, 27, 392–403.

Barton, L. L., & Nortup, D. E. (2011). *Microbial ecology*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.

Bassalik, C., Janota-Bassalik, L., & Brisou, J. (1960). Etude sur *Flavobacterium extorquens* (ex. *Pseudomonas extorquens*). *Ann. Inst. Pasteur.*, 98.

Bassalik, K. (1913). Ueber die Verarbeitung der Oxalsäure durch *Bacillus extorquens* n. Sp. *Jahrb. Botan.*, 53.

Beemelmans, C., Guo, H., Rischer, M., & Poulsen, M. (2016). Natural products from microbes associated with insects. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12, 314–327.

Bellion, E., & Spain, J. C. (1976). The distribution of the isocitrate lyase serine pathway amongst one-carbon utilising organisms. *Can. J. Microbiol.*, 22.

Bellotti, A. C., & Villegas G, A. (2018). Biología, morfología y hábitos de *Lagocheirus araneiformis* Linne (Coleoptera: Cerambycidae) barrenador de la yuca en Palmira (Valle del Cauca). *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*.

Benndorf, R., Guo, H., Sommerwerk, E., Weigel, C., Garcia-Altare, M., Martin, K., ... Beemelmans, C. (2018). Natural Products from Actinobacteria Associated with Fungus-Growing Termites. *Antibiotics*, 20 - 25.

Berasategui, A., Salem, H., Paetz, C., Santoro, M., Gershenzon, J., Kaltenpoth, M., & Schmidt, A. (2017). Gut microbiota of the pine weevil degrades conifer diterpenes and increases insect fitness. *Molecular Ecology*, 26, 4099–4110.

Berkov, A., & Monné, M. A. (2010). A new species of *Neobaryssinus* Monné & Martins, and two new species of *Baryssiniella* new genus (Coleoptera: Cerambycidae), reared from trees in the Brazil nut family (Lecythidaceae). *Zootaxa*, 2538, 47–59.

Berkov, A., Feinstein, J., Small, J., Nkamany, M., & Centeno, P. (2007). Yeasts Isolated from Neotropical Wood-Boring Beetles in SE Peru. *Biotropica*, 39, 530–538.

Bernardo-Mazariegos, E., Valdez-Salas, B., González-Mendoza, D., Abdelmoteleb, A., Tzintzun Camacho, O., Cedeña Duran, C., & Gutiérrez-Miceli, F. (2019). Silver nanoparticles from *Justicia spicigera* and their antimicrobial potentialities in the biocontrol of foodborne bacteria and phytopathogenic fungi. *Revista Argentina de Microbiología*, 51, 103–109.

Bhat, J. V., & Barker, H. A. (1948). Studies on a new oxalate decomposing bacterium, *Vibrio oxalaticus*. *J. Bacteriol.*, 55.

Bili, M., Cortesero, A. M., Mougél, C., Gauthier, J. P., Ermel, G., Simon, J. C., ... Poinso, D. (2016). Bacterial Community Diversity Harboured by Interacting Species. *PLOS ONE*, 11, e0155392.

Binda, C., Lopetuso, L. R., Rizzatti, G., Gibiino, G., Cennamo, V., & Gasbarrini, A. (2018). Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Digestive and Liver Disease*, 50, 421–428.

Blackburn, M. B., Gundersen-Rindal, D. E., Weber, D. C., Martin, P. A. W., & Farrar, R. R. (2008). Enteric bacteria of field-collected Colorado potato beetle larvae inhibit growth of the entomopathogens *Photobacterium* *temperata* and *Beauveria bassiana*. *Biological Control*, 46, 434–441.

Bode, H. B. (2009). Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current opinion in Chemical Biology*, 224 - 230.

Boege, K., & del Val, E. (2011). Bichos vemos relaciones no sabemos. *CIENCIAS*, 5 - 11.

Book, A. J., Lewin, G. R., McDonald, B. R., Takasuka, T. E., Wendt-Pienkowski, E., Doering, D. T., ... Currie, C. R. (2016). Evolution of High Cellulolytic Activity in Symbiotic *Streptomyces* through Selection of Expanded Gene Content and Coordinated Gene Expression. *PLOS Biology*, 14, e1002475.

Boone, C. K., Keefover-Ring, K., Mapes, A. C., Adams, A. S., Bohlmann, J., & Raffa, K. F. (2013). Bacteria Associated with a Tree-Killing Insect Reduce Concentrations of Plant Defense Compounds. *Microbial Chemical Ecology*, 39, 1003–1006.

Borm, S., Buschunger, A., Boomsma, J. J., & Billien, J. (2002). *Tetraponera* ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. *PROCEEDING OF THE ROYAL SOCIETY BIOLOGICAL SCIENCES*, 1 - 12.

Boucias, D. G., Zhou, Y., Huang, S., & Keyhani, N. O. (2018). Microbiota in insect fungal pathology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 5873–5888.

Bousfield, I. J., & Green, P. N. (1985). Reclassification of bacteria of the genus *Protomonas* Urakami and Komagata 1984 in the genus *Methylobacterium*. (Patt, Cole and Hanson) emend. Green and Bousfield 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35.

Bratina, B. J., Brusseau, G. A., & Hanson, R. S. (1992). Use of 16S rRNA analysis to investigate phylogeny of methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42.

Broderick, N. A., Raffa, K. F., Goodman, R. M., & Handelsman, J. (2020). Census of the Bacterial Community of the Gypsy Moth Larval Midgut by Using Culturing and Culture-Independent Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 1 - 21.

- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: An Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 25, 2–41.
- Brucker, R. M., & Bordenstein, S. R. (2012). Speciation by symbiosis. *Trends in Ecology & Evolution*, 27, 443–451.
- Brummel, T., Ching, A., Seroude, L., Simon, A. F., & Benzer, S. (2004). *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 12974–12979. .
- Buchon, N., Broderick, N. A., & Lemaitre, B. (2013). Gut homeostasis in a microbial world: Insights from *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews. Microbiology*, 11, 615–626.
- Calderón-Cortés, N., Quesada, M., & Escalera-Vázquez-Anslan, S., Bahram, M., & Tedersoo, L. (2016). Temporal changes in fungal communities associated with guts and appendages of Collembola as based on culturing and high-throughput sequencing. *Soil Biology and Biochemistry*, 152–159.
- Calderón-Cortés, N., Quesada, M., & Escalera-Vázquez, L. H. (2011). Insects as Stem Engineers: Interactions Mediated by the Twig-Girdler *Oncideres albomarginata* chamela Enhance Arthropod Diversity. *PLOS ONE*, 1 - 9.
- Calderón-Cortés, N., Watanabe, H., Cano-Camacho, H., Zavala-Páramo, G., & Quesada, M. (2010). CADN cloning, homology modelling and evolutionary insights into novel endogenous cellulases of the borer beetle *Oncideres albomarginata* chamela (Cerambycidae). *Insect Molecular Biology*, 19, 323–336.
- Calderón-Cortés, Nancy, Uribe-Mú, C. A., Martínez-Méndez, A. K., Escalera-Vázquez, L. H., Cristobal-Pérez, E. J., García-Oliva, F., & Quesada, M. (2016). Ecosystem engineering and manipulation of host plant tissues by the insect borer *Oncideres albomarginata* chamela. *Journal of Insect Physiology*, 84, 128–136.
- Cavaliere, M., Feng, S., Soyer, O. S., & Jiménez, J. I. (2017). Cooperation in microbial communities and their biotechnological applications. *Environmental Microbiology*, 19, 2949–2963.
- Chakraborty, A., Modlinger, R., Ashraf, M. Z., Synek, J., Schlyter, F., & Roy, A. (2020). Core Mycobiome and Their Ecological Relevance in the Gut of Five Ips Bark Beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Challinor, V. L., & Bode, H. B. (2015). Bioactive natural products from novel microbial sources. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354, 82–97.
- Challis, G. L., & Hopwood, D. A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl 2, 14555–14561.
- Charroux, B., & Royet, J. (2012). Gut-microbiota interactions in non-mammals: What can we learn from *Drosophila*? *Seminars in Immunology*, 24, 17–24.
- Chen, B., Teh, B. S., Sun, C., Hu, S., Lu, X., Boland, W., & Shao, Y. (2016). Biodiversity and Activity of the Gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*. *Scientific Reports*, 6, 29505.
- Chen, Y.-H., Lu, M.-H., Guo, D.-S., Zhai, Y.-Y., Miao, D., Yue, J.-Y., ... An, D.-R. (2019). Antifungal Effect of Magnolol and Honokiol from *Magnolia officinalis* on *Alternaria alternata* Causing Tobacco Brown Spot. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24, E2140.
- Chevrette, M. G., Gutiérrez-García, K., Selem-Mojica, N., Aguilar-Martínez, C., Yañez-Olvera, A., Ramos-Aboites, H. E., ... Barona-Gómez, F. (2020). Evolutionary dynamics of natural product biosynthesis in bacteria. *Natural Product Reports*, 37, 566–599.
- Chevrette, M., Carlson, C., Ortega, H., Thomas, C., Ananiev, G., & Barns, K. (2019). The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nature communications*, 1 - 11.

Chouvenc, T., Efstathion, C. A., Elliott, M. L., & Su, N.-Y. (2013). Extended disease resistance emerging from the faecal nest of a subterranean termite. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280, 20131885.

Clark, R. I., Salazar, A., Yamada, R., Fitz-Gibbon, S., Morselli, M., Alcaraz, J., ... Walker, D. W. (2015). Distinct Shifts in Microbiota Composition during Drosophila Aging Impair Intestinal Function and Drive Mortality. *Cell Reports*, 12, 1656–1667.

Cleveland, L. R. (1924). The Physiological and Symbiotic Relationships Between The Intestinal Protozoa Of Termites And Their Host, With Special Reference To Reticulitermes Flavipes Kollar. *Biological Bulletin*. 25.

Colby, J., & Zatman, L. J. (1973). Trimethylamine metabolism in obligate and facultative methylotrophs. *Biochem J*, 132.

Colman, D. R., Toolson, E. C., & Takacs-Vesbach, C. D. (2012). Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Molecular Ecology*, 21, 5124–5137.

Cook, D. (2020). A Historical Review of Management Options Used against the Stable Fly (Diptera: Muscidae). *Insects*, 11, 313.

Cook, S. C., & Davidson, D. W. (2006). Nutritional and functional biology of exudate-feeding ants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1 - 10.

Corpe, W. A., & Basile, D. V. (1982). Methanol-utilising bacteria associated with green plants. *Dev. Indust. Microbiol.* 23.

Currie, C. R., Bot, A. N. M., & Boomsma, J. J. (2003). Experimental Evidence of a Tripartite Mutualism: Bacteria Protect Ant Fungus Gardens from Specialized Parasites. *Oikos*, 101, 91–102.

da Costa, R. R., Hu, H., Li, H., & Poulsen, M. (2019). Symbiotic Plant Biomass Decomposition in Fungus-Growing Termites. *Insects*, 10, 87.

Dastager, S. G., Li, W. J., Dayanand, A., Tang, S.-K., Tian, X.-P., Zhi, X.-Y., ... Jiang, C.-L. (2006). Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in Streptomyces. *African Journal of Biotechnology*, 5.

David, A. S., Kaser, J. M., Morey, A. C., Roth, A. M., & Andow, D. A. (2013). Release of genetically engineered insects: A framework to identify potential ecological effects. *Ecology and Evolution*, 3, 4000–4015.

Delalibera, I., Handelsman, J., & Raffa, K. F. (2005). Contrasts in Cellulolytic Activities of Gut Microorganisms Between the Wood Borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the Bark Beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 34, 541–547.

Dethlefsen, L. M., & Relman, D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *NATURE*, 811-818.

Diepinois, G., Opota, O., Lalucat, J., & Lemaitre, B. (2015). *Pseudomonas entomophila*: A Versatile Bacterium with Entomopathogenic Properties. *Springer*, 25 - 49.

Donova, M. V. (2007). [Transformation of steroids by actinobacteria: A review]. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 43, 5–18.

Doronina, N. V., Trotsenko, Y. A., Tourova, T. P., Kuznetsov, B. B., & Leisinger, T. (2000). *Methylopila helvetica* sp. Nov. And *Methylobacterium dichloromethanicum* sp. nov. - novel facultatively methylotrophic bacteria utilising dichloromethane. *Syst. Appl. Microbiol*, 23.

Doudoroff, M., & Palleroni, N. J. (1974). In R. E. Buchanan & N. E. Gibbons (Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, MD: Wilkins.

- Douglas, A. E. (2007). Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. *TRENDS in Biotechnology*, 338 - 342.
- Douglas, A. E. (2009). The Microbial Dimension in Insect Nutritional Ecology. *Functional Ecology*, 23, 38–47.
- Douglas, A. E. (2011). Lessons from Studying Insect Symbioses. *Cell Host & Microbe*, 359 - 368.
- Douglas, A. E. (2013). Microbial Brokers of Insect-Plant Interactions Revisited. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 952–961.
- Douglas, A. E. (2014). The molecular basis of bacterial-insect symbiosis. *Journal of Molecular Biology*, 426, 3830–3837.
- Douglas, Angela E. (2015). Multiorganismal Insects: Diversity and Function of Resident Microorganisms. *Annual Review of Entomology*, 60, 17–34.
- Douglas, Angela E. (2018). The Drosophila model for microbiome research. *Lab Animal*, 47, 157–164.
- Dourado, M. N., Camargo Neves, A. A., Santos, D. S., & Araújo, W. L. (2015). Biotechnological and agronomic potential of endophytic, pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp. *BioMed Research International*, 2015, 909016.
- Downs, J., & Harrison, D. E. F. (1974). Studies on the production of pink pigment in *Pseudomonas extorquens* NCIB 9399 growing in continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.*, 37.
- Dreyfus, B., Garcia, J. L., & Gillis, M. (1988). Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. Nov., sp. Nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 38.
- Duan, D.-Y. (1), Liu, G.-H. (1), & Cheng, T.-Y. (1, 2). (2020). Microbiome analysis of the saliva and midgut from partially or fully engorged female adult *Dermacentor silvarum* ticks in China. *Experimental and Applied Acarology*, 80, 543–558.
- Dudeja, S., Dudeja, S. S., Paul, M., Maheswari, R., & Kothe, E. (2021). Bacterial endophytes: Molecular interactions with their hosts About Wiley Online Library Privacy Policy Terms of Use Cookies Accessibility. *Journal of Basic Microbiology*, April, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.202000657>.
- Duménil, G., Crémieux, A., Couderc, R., Chevalier, J., Guiraud, H., & Ballerini, D. (1979). Production of vitamin B12 by gram-variable methanol-utilizing bacteria. *Biotechnology Letters*, 1, 371–376.
- Dunn, A. K., & Stabb, E. V. (2020). Culture-Independent Characterization of the Microbiota of the Ant Lion *Myrmeleon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 8784 - 8794.
- Dworkin, M., & Foster, J. W. (1956). Studies on *Pseudomonas methanica* (Söhngen) nov. Comb. *J. Bacteriol.*, 72.
- Edris, A., & Farrag, E. (2003). Antifungal activity of Peppermint and Sweet Basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Die Nahrung*, 47, 117–121.
- El-Dawy, E. G. A. E. M., Gherbawy, Y. A., & Hussein, M. A. (2021). Morphological, molecular characterization, plant pathogenicity and biocontrol of *Cladosporium* complex groups associated with faba beans. *Scientific Reports*, 11, 14183.
- El-Naggar, N. E.-A., & El-Ewasy, S. M. (2017). Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Scientific Reports*, 7, 42129.
- El-Naggar, N. E.-A., & Saber, W. I. A. (2022). Natural Melanin: Current Trends, and Future Approaches, with Especial Reference to Microbial Source. *Polymers*, 14, 1339.

Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology reviews*, 1-37.

Engl, T., Kroiss, J., Kai, M., Nechitaylo, T. Y., Svatoš, A., & Kaltenpoth, M. (2018a). Evolutionary stability of antibiotic protection in a defensive symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, E2020–E2029.

Eski, A., çakici, F., Güllü, M., Muratoğlu, H., Demirbag, Z., & Demir, I. (2015). Identification and pathogenicity of bacteria in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae). *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*, 39, 31–48.

Fabryová, A., Kostovčík, M., Díez-Méndez, A., Jiménez-Gómez, A., Celador-Lera, L., Saati-Santamaría, Z., ... García-Fraile, P. (2018). On the bright side of a forest pest-the metabolic potential of bark beetles' bacterial associates. *The Science of the Total Environment*, 619–620, 9–17.

Farris, M. H., & Olson, J. B. (2007). Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 376–381.

Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: From networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 538–550.

Fedoseeva, E. V., Tereshina, V. M., Danilova, O. A., Ianutsevich, E. A., Yakimenko, O. S., & Terekhova, V. A. (2021). Effect of humic acid on the composition of osmolytes and lipids in a melanin-containing phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Environmental Research*, 193, 110395.

Fischer, C. N., Trautman, E. P., Crawford, J. M., Stabb, E. V., Handelsman, J., & Broderick, N. A. (2017). Metabolite exchange between microbiome members produces compounds that influence *Drosophila* behavior. *ELife*, 1 - 25.

Foster, K. R., & Wenseleers, T. (2006). A general model for the evolution of mutualisms. *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 1283–1293.

Freimoser, F. M., Hu, G., & Leger, R. J. S. 2005. (n.d.). Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology*, 151, 361–371.

Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O., & Samson, R. A. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies In Mycology* 49: 201-241.

Furuhata, K., Banzai, A. U., Kawakami, Y., Ishizaki, N., Yoshida, Y., Goto, K., & Fukuyama, M. (2011). Genotyping and Chlorine-Resistance of *Methylobacterium aquaticum* Isolated from Water Samples in Japan. *Biocontrol Science*, 16, 103–107.

Furuhata, K., Kato, Y., Goto, K., Hara, M., Yoshida, S., & Fukuyama, M. (2006a). Isolation and identification of *methylobacterium* species from the tap water in hospitals in Japan and their antibiotic susceptibility. *Microbiology and Immunology*, 50, 11–17.

Furuhata, K., Kato, Y., Goto, K., Saitou, K., Sugiyama, J.-I., Hara, M., & Fukuyama, M. (2008). Identification of Pink-Pigmented Bacteria Isolated from Environmental Water Samples and Their Biofilm Formation Abilities. *Biocontrol Science*, 13, 33–39.

García, M. A. G., García, S. C., Gordillo, J. M. L., & Martínez, R. F. M. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*, 10, 21–28.

Geib, S., Jimenez-Gasco, M. del M., Carlson, J., Tien, M., Jabbour, R., & Hoover, K. (2009). Microbial Community Profiling to Investigate Transmission of Bacteria Between Life Stages of the Wood-Boring Beetle, *Anoplophora glabripennis*. *Microbial Ecology*, 58, 199–211.

Gilardi, G. L., & Faur, Y. C. (1984). *Pseudomonas mesophilica* and an unnamed taxon, clinical isolates of pink-pigmented oxidative bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 20.

Glare, T. R., Jurat-Fuentes, J. L., & O'Callaghan, M. (2017). Chapter 4 - Basic and Applied Research: Entomopathogenic Bacteria. En L. Lacey, *Microbial Control of Insect and Mite Pests* (págs. 47 - 67). NY: Academic Press.

González-Tokman, D., González-Santoyo, I., & C.-A. A. (2018). Introduction. In: *Insect Behavior: From mechanisms to ecological and evolutionary consequences*. En A. Córdoba-Aguilar, D. González-Tokman, & I. González-Santoyo, *Insect Behavior: From mechanisms to ecological and evolutionary consequences*. (págs. 1 - 2). London: Oxford University Press.

Gräf, W., & Bauer, L. (1973). Red bacterial growth (*Corynebacterium rubrum*) n. Spec. In tap water systems. *Zentralbl. Bakteriol. (Abteilung II)*, 73.

Green, P. N., & Bousfield, I. J. (1981). In H. Dalton (Ed.), *The taxonomy of pink-pigmented facultatively methylotrophic bacteria*. London: Heyden and Son.

Green, P. N., & Bousfield, I. J. (1982). A taxonomic study of some Gram-negative facultatively methylotrophic bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 128.

Green, P. N., & Bousfield, I. J. (1983). Emendation of *Methylobacterium patt*, Cole and Hanson 1976, *Methylobacterium rhodinum* (Heumann 1962) comb. Nov. Corrig.; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Iizuka 1971), comb. Nov. Corrig., and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) comb. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33.

Green, P. N., & Bousfield, I. J. (1988). Three new *Methylobacterium* species: *M. rhodesianum* sp. Nov., *M. zatmanii* sp. Nov., and *M. fujisawaense* sp. Nov. *Inst. J. Syst. Bacteriol.*, 38. h

Green, P., & Ardley, J. (2018). Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: A proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68

Green, Peter N. (2006). *Methylobacterium*. In Martin Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses* (pp. 257–265). New York, NY: Springer.

Grubbs, K. J., May, D. S., Sardina, J. A., Dermenjian, R. K., Wyche, T. P., Pinto-Tomás, A. A., ... Currie, C. R. (2021). Pollen *Streptomyces* Produce Antibiotic That Inhibits the Honeybee Pathogen *Paenibacillus* larvae. *Frontiers in Microbiology*, 12.

Grünwald, S., Pilhofer, M., & Holl, W. (2010). Microbial associations in gut systems of wood- and bark-inhabiting longhorned beetles [Coleoptera: Cerambycidae]. *Systematic and Applied Microbiology*, 25-34.

Guedez, C. (2014). CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE *BEAUVERIA BASSIANA*, AISLADA DE DIFERENTES INSECTOS EN TRUJILLO- VENEZUELA. *Revista Academia*, XV, 275–281.

Guerra, B. E., Chacón, J. G., Muñoz, J. E., & Milena-Caicedo, A. (2014). Evaluación de la patogenicidad de *Xenorhabdus* spp. nativos en Colombia. *Rev. colomb. biotecnol*, 1 - 12.

Guo, L., Karpac, J., Tran, S. L., & Jasper, H. (2014). PGRP-SC2 Promotes Gut Immune Homeostasis to Limit Commensal Dysbiosis and Extend Lifespan. *Cell*, 156, 109–122.

- Guo, Y., Lin, Q., Chen, L., Carballar-Lejarazú, R., Zhang, A., Shao, E., ... Wu, S. (2020). Characterization of bacterial communities associated with the pinewood nematode insect vector *Monochamus alternatus* Hope and the host tree *Pinus massoniana*. *BMC Genomics*, 21, 337.
- Gupta, A., & Nair, S. (2020). Dynamics of Insect–Microbiome Interaction Influence Host and Microbial Symbiont. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Gurung, K., Wertheim, B., & Falcao Salles, J. (2019). The microbiome of pest insects: It is not just bacteria. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167, 156–170.
- Hadi Chegeni, A., Hadi, F., Kowsari³, M., Zare, M., & Gholami Mohammadi, A. (2019). Antifungal activity of native bacteria isolated from Khorramabad agricultural soil. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*, 26, 383–391.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hansen, A. K., & Moran, N. A. (2014). The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Molecular Ecology*, 23, 1473–1496.
- Hanshew, A. S., McDonald, B. R., Díaz Díaz, C., Djiéto-Lordon, C., Blatrix, R., & Currie, C. R. (2015). Characterization of Actinobacteria Associated with Three Ant–Plant Mutualisms. *Microbial Ecology*, 69, 192–203.
- Hanson, R. S. (1980). Ecology and diversity of methylotrophic organisms. *Adv. Appl. Microbiol.*, 6.
- Harrington, A. A., & Kallio, R. E. (1960). Oxidation of methanol and formaldehyde by *Pseudomonas methanica*. *Can. J. Microbiol.*, 6.
- Heise, P., Liu, Y., Degenkolb, T., Vogel, H., Schäberle, T. F., & Vilcinskas, A. (2019). Antibiotic-Producing Beneficial Bacteria in the Gut of the Burying Beetle *Nicrophorus vespilloides*. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Hernández-García, J. A., Briones-Roblero, C. I., Rivera-Orduña, F. N., & Zúñiga, G. (2017). Revealing the gut bacteriome of *Dendroctonus* bark beetles (Curculionidae: Scolytinae): diversity, core members and co-evolutionary patterns. *Scientific Reports*, 7, 13864.
- Heumann, W. (1962). Die Methodik der Kreuzung sternbildener Bakterien. *Biol. Zentralbl.*, 81.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., & Werren, J. H. (2008). How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters*, 281, 215–220.
- Hillesland, Kristina L., & Stahl, D. A. (2010). Rapid evolution of stability and productivity at the origin of a microbial mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 2124–2129.
- Hillesland, Kristina Linnea. (2018). Evolution on the bright side of life: Microorganisms and the evolution of mutualism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1422, 88–103.
- Hood, D. W., Dow, C. S., & Green, P. N. (1987). ADN hybridization studies on the pink pigmented facultative methylotrophs. *J. Gen. Microbiol.*, 133.
- Hood, D. W., Dow, C. S., & Green, P. N. (1988). Electrophoretic comparison of total soluble proteins in the pink-pigmented facultative methylotrophs. *J. Gen. Microbiol.*, 134.
- Hou, C. T. (1984). *Methylotrophs: Microbiology, Biochemistry and Genetics*. Florida: CRC Press.
- Huang, H., Ren, L., Li, H., Schmidt, A., Gershenzon, J., Lu, Y., & Cheng, D. (2020). The nesting preference of an invasive ant is associated with the cues produced by actinobacteria in soil. *PLoS Pathogens*, 1 - 21.
- Hug, J. J., Krug, D., & Müller, R. (2020). Bacteria as genetically programmable producers of bioactive natural products. *Nature Reviews Chemistry*, 4, 172–193.

Ignasiak, K., & Maxwell, A. (2017). Antibiotic-resistant bacteria in the guts of insects feeding on plants: Prospects for discovering plant-derived antibiotics. *BMC Microbiology*, 17, 223.

Ishikawa, H. (2003). *Insect Symbiosis: An Introduction*. Boca Raton, FL: CRC PRESS.

Ito, H., & Iizuka, H. (1971). Part XIII: Taxonomic studies on a radio-resistant *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.*, 35.

Jabeen, F., Hussain, A., Manzoor, M., Younis, T., Rasul, A., & Qazi, J. (2018). Potential of bacterial chitinolytic, *Stenotrophomonas maltophilia*, in biological control of termites. *Egyptian Journal of Pest Control*, 28, 1–10.

Jami, M., Ghanbari, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2015). Phylogenetic diversity and biological activity of culturable Actinobacteria isolated from freshwater fish gut microbiota. *Microbiological Research*, 175, 6–15.

Jang, S., & Kikuchi, Y. (2020). Impact of the insect gut microbiota on ecology, evolution, and industry. *Current Opinion in Insect Science*, 33 - 39.

Jing, T.-Z., Qi, F.-H., & Wang, Z.-Y. (2020). Most dominant roles of insect gut bacteria: Digestion, detoxification, or essential nutrient provision? *Microbiome*, 8, 38.

Joel L. Sachs, U. G. (2004). The evolution of cooperation. *The Quarterly Review of Biology*, 135-160.

Jones, R. T., Sanchez, L. G., & Fierer, N. (2013). A Cross-Taxon Analysis of Insect-Associated Bacterial Diversity. *PLOS ONE*, 8, e61218.

Jong, L. E. (1927). Ueber protaminophage Bakterien. *Zentralbl. Akteriologie (Abteilung II)*, 71.

Jose, P. A., Maharshi, A., & Jha, B. (2021). Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiological Research*, 246, 126708.

Jourand, P., Renier, A., Rapior, S., de Faria, S. M., Prin, Y., Galiana, A., ... Dreyfus, B. (2005). Role of Methylophily During Symbiosis Between *Methylobacterium nodulans* and *Crotalaria podocarpa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 1061–1068.

Kabaluk, T., Li-Leger, E., & Nam, S. (2017). *Metarhizium brunneum* – An enzootic wireworm disease and evidence for its suppression by bacterial symbionts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 150, 82–87.

Kaczmarczyk, A., Kucharczyk, H., Kucharczyk, M., Kapusta, P., Sell, J., & Zielińska, S. (2018). First insight into microbiome profile of fungivorous thrips *Hoplothrips carpathicus* (Insecta: Thysanoptera) at different developmental stages: molecular evidence of *Wolbachia* endosymbiosis. *Scientific Reports*, 8, 14376.

Kadosh, D., & Mundodi, V. (2020). A Re-Evaluation of the Relationship between Morphology and Pathogenicity in *Candida* Species. *Journal of Fungi*, 6, 13.

Kageyama, D., Narita, S., & Watanabe, M. (2012). Insect Sex Determination Manipulated by Their Endosymbionts: Incidences, Mechanisms and Implications. *Insects*, 3, 161–199.

Kaltenpoth, M. (2009). Actinobacteria as mutualists: General healthcare for insects? *Trends in Microbiology*, 17, 529–535.

Kaltenpoth, M., Göttler, W., Herzner, G., & Strohm, E. (2005). Symbiotic Bacteria Protect Wasp Larvae from Fungal Infestation. *Current Biology*, 15, 475–479.

Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 235, 5867–5881.

Kaya, H., & Vega, F. (2012). *Scope and Basic Principles of Insect Pathology*. In *Insect Pathology* (pp. 1–12).

- Kerr, J. R. (1999). Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11, 129–142.
- Ketchum, R. N., Smith, E. G., Vaughan, G. O., Phippen, B. L., McParland, D., Al-Mansoori, N., ... Reitzel, A. M. (2018). ADN Extraction Method Plays a Significant Role When Defining Bacterial Community Composition in the Marine Invertebrate *Echinometra mathaei*. *Frontiers in Marine Science*, 5.
- Khankhet, J., Vanderwolf, K. J., McAlpine, D. F., McBurney, S., Overy, D. P., Slavic, D., & Xu, J. (2014). Clonal Expansion of the *Pseudogymnoascus destructans* Genotype in North America Is Accompanied by Significant Variation in Phenotypic Expression. *PLOS ONE*, 9, e104684.
- Kikuchi, Y., Meng, X.-Y., & Fukatsu, T. (2005). Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocoris chinensis* (Heteroptera: Alydidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 4035 - 4043.
- Kim, J., Kwon, J., Kim, M., Do, J., Lee, D., & Han, H. (2016). Low-dielectric-constant polyimide aerogel composite films with low water uptake. *Polymer Journal*, 48, 829–834.
- Kim, S. H., Park, G., Park, J.-S., & Kwon, H. C. (2021). Antifungal *Streptomyces* spp., Plausible Partners for Brood-Caring of the Dung Beetle *Copris tripartitus*. *Microorganisms*, 9, 1980.
- Knani, M., Corpe, W., & Rohmer, M. (1994). Bacterial hopanoids from pink-pigmented facultative methylotrophs (PPFMs) and from green plant surfaces. *Microbiology*, 140.
- Kneip, C., Lockhart, P., Voß, C., & Maier, U.-G. (2007). Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology*, 1 - 12.
- Kostovcik, M., Bateman, C. C., Kolarik, M., Stelinski, L. L., Jordal, B. H., & Hulcr, J. (2015). The ambrosia symbiosis is specific in some species and promiscuous in others: Evidence from community pyrosequencing. *The ISME Journal*, 126–138.
- Kouno, K., & Ozaki, A. (1975). In *Distribution and identification of methanol-utilizing bacteria*. Osaka, Japan: *Society of Fermentation Technology*.
- Krasil'nikov, N. A. (1959). *Diagnostik der Bakterien und Actinomyceten* (Russian original, 1949). Jena, GDR.: Gustav Fischer.
- Kroiss, J. (1, 5), Maddula, R. k. (1), Svatos, A. (1), Kaltenpoth, M. (2, 5), Strohm, E. (2), Schneider, B. (3), ... Hertweck, C. (4). (2010). Symbiotic streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. *Nature Chemical Biology*, 6, 261–263.
- Kumar, S., Chandra, A., & Pandey, K. C. (2008). *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: An environment friendly insect-pest management strategy. 13.
- Lee, K.-A., Kim, S.-H., Kim, E.-K., Ha, E.-M., You, H., Kim, B., ... Lee, W.-J. (2013). Bacterial-Derived Uracil as a Modulator of Mucosal Immunity and Gut-Microbe Homeostasis in *Drosophila*. *Cell*, 153, 797–811.
- Lee, L.-H., Zainal, N., Azman, A.-S., Eng, S.-K., Goh, B.-H., Yin, W.-F., ... Chan, K.-G. (2014). Diversity and Antimicrobial Activities of Actinobacteria Isolated from Tropical Mangrove Sediments in Malaysia. *The Scientific World Journal*, 2014, e698178.
- Lee, M.-C., & Marx, C. J. (2012). Repeated, selection-driven genome reduction of accessory genes in experimental populations. *PLoS Genetics*, 8, e1002651.
- Leeming, E. R., Louca, P., Gibson, R., Menni, C., Spector, T. D., & Le Roy, C. I. (2021). The complexities of the diet-microbiome relationship: Advances and perspectives. *Genome Medicine*, 13, 10.
- Lennon, J. T., & Locey, K. J. (2020). More support for Earth' s massive microbiome. *Biology Direct*, 15, 5.

Levin, D., Raab, N., Pinto, Y., Rothschild, D., Zanir, G., Godneva, A., ... Segal, E. (2021). Diversity and functional landscapes in the microbiota of animals in the wild. *SCIENCE*, 372, 254+.

Lewis, Z., & Lize, A. (2015). Insect behavior and the microbiome. *Current Opinion in Insect Science*, 86–90.

Ley, J. (1978). *Modern molecular methods in bacterial taxonomy*. Evaluation, application, prospects. In I. N. R. A. Angers (Ed.), *Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Tours, France: Gibert-Clarey.

Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., ... Gordon, J. I. (2008). *Evolution of Mammals and Their Gut Microbes*. *Science*, 320, 1647–1651.

Li, C., Lim, K. M. K., Chng, K. R., & Nagarajan, N. (2016). Predicting microbial interactions through computational approaches. *Methods* (San Diego, Calif.), 102, 12–19.

Li, H., Young, S. E., Poulsen, M., & Currie, C. R. (2021). Symbiont-Mediated Digestion of Plant Biomass in Fungus-Farming Insects. *Annual Review of Entomology*, 66, 297–316.

Li, L., & Ab Majid, A. H. (2021). Characterization of bacterial communities associated with blood-fed and starved tropical bed bugs, *Cimex hemipterus* (F.) (Hemiptera): A high throughput metabarcoding analysis. *Scientific Reports*, 11.

Li, W.-R., Shi, Q.-S., Liang, Q., Huang, X.-M., & Chen, Y.-B. (2014). Antifungal effect and mechanism of garlic oil on *Penicillium funiculosum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 8337–8346.

Li, W.-R., Shi, Q.-S., Ouyang, Y.-S., Chen, Y.-B., & Duan, S.-S. (2013). Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7483–7492.

Liaw, S.-J., Lee, Y.-L., & Hsueh, P.-R. (2010). Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: Roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucosyltransferase (SpgM), and melanin and biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 126–130.

Lidicker, W. Z., Jr. (1979). A Clarification of Interactions in Ecological Systems. *BioScience*, 29, 475–477.

Lindgren, B. S., & Raffa, K. F. (2013). Evolution of tree killing in bark beetles (Coleoptera: Curculionidae): trade-offs between the maddening crowds and a sticky situation. *The Canadian Entomologist*, 145, 471–495.

Liu, H., Xiong, W., Zhang, R., Hang, X., Wang, D., Rong, L., & Shen, Q. (2018). Continuous application of different organic additives can suppress tomato disease by inducing the healthy rhizospheric microbiota through alterations to the bulk soil microflora. *Plant and Soil*, 423, 1–12.

Liu, Q.-X., Su, Z.-P., Liu, H.-H., Lu, S.-P., Ma, B., Zhao, Y., ... Shi, Z.-H. (2021). The Effect of Gut Bacteria on the Physiology of Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier and Their Potential for the Control of This Pest. *Insects*, 12, 594.

Liu, W., Yu, S.-H., Zhang, H.-P., Fu, Z.-Y., An, J.-Q., Zhang, J.-Y., & Yang, P. (2022). Two *Cladosporium* Fungi with Opposite Functions to the Chinese White Wax Scale Insect Have Different Genome Characters. *Journal of Fungi*, 8, 286.

Lizé, A., McKay, R., & Lewis, Z. (2014). Kin recognition in *Drosophila*: The importance of ecology and gut microbiota. *The ISME Journal*, 8, 469–477.

Long, Y.-H., Xie, L., Liu, N., Yan, X., Li, M.-H., Fan, M.-Z., & Wang, Q. (2010). Comparison of gut-associated and nest-associated microbial communities of a fungus-growing termite (*Odontotermes yunnanensis*). *Insect Science*, 17, 265–276.

Lu, J., Tian, Z., Yu, J., Yang, M., & Zhang, Y. (2018). Distribution and Abundance of Antibiotic Resistance Genes in Sand Settling Reservoirs and Drinking Water Treatment Plants across the Yellow River, China. *Water*, 10, 246.

- Lu, M., Hulcr, J., & Sun, J. (2016). The Role of Symbiotic Microbes in Insect Invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 47.
- Lv, D., Liu, X., Dong, Y., Yan, Z., Zhang, X., Wang, P., ... Li, Y. (2021). Comparison of Gut Bacterial Communities of Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) Reared on Different Host Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 11266.
- Lynch, M. J., Wopat, A. E., & O' Connor, M. L. (1980). Characterisation of two facultative methanotrophs. *Appl. Env. Microbiol.*, 40.
- Ma, G., Bao, S., Zhao, J., Sui, Y., & Wu, X. (2021). Morphological and Molecular Characterization of *Alternaria* Species Causing Leaf Blight on Watermelon in China. *Plant Disease*, 105, 60–70.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos*. Madrid: PEARSON EDUCACIÓN, S.A.
- Majumder, R., Sutcliffe, B., Taylor, P. W., & Chapman, T. A. (2020). Fruit host-dependent fungal communities in the microbiome of wild Queensland fruit fly larvae. *Scientific Reports*, 10, 16550.
- Malacrinò, A. (2018). Meta-Omics Tools in the World of Insect-Microorganism Interactions. *Biology*, 3 - 9.
- Malacrinò, A., Schena, L., Campolo, O., Laudani, F., Mosca, S., Giunti, G., . . . Palmeri, V. (2017). A Metabarcoding Survey on the Fungal Microbiota Associated to the Olive Fruit Fly. *Microbial Ecology*, 677 - 684.
- Malassigné, S., Minard, G., Vallon, L., Martin, E., Valiente Moro, C., & Luis, P. (2021). Diversity and Functions of Yeast Communities Associated with Insects. *Microorganisms*, 9, 1552.
- Marchal, M., Goldschmidt, F., Derksen-Müller, S. N., Panke, S., Ackermann, M., & Johnson, D. R. (2017). A passive mutualistic interaction promotes the evolution of spatial structure within microbial populations. *BMC Evolutionary Biology*, 17, 106.
- Martins, K. A., Meirelles, M. H. de A., Mota, T. F., Abbasi, I., Queiroz, A. T. L. de, Brodskyn, C. I., ... Warburg, A. (2021). Effects of larval rearing substrates on some life-table parameters of *Lutzomyia longipalpis* sand flies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15, e0009034.
- Mason, C. J., Long, D. C., McCarthy, E. M., Nagachar, N., Rosa, C., Scully, E. D., ... Hoover, K. (2017). Within gut physicochemical variation does not correspond to distinct resident fungal and bacterial communities in the tree-killing xylophage, *Anoplophora glabripennis*. *Journal of Insect Physiology*, 102, 27–35.
- Matarrita-Carranza, B., Moreira-Soto, R. D., Murillo-Cruz, C., Mora, M., Currie, C. R., & Pinto-Tomas, A. A. (2017). Evidence for Widespread Associations between Neotropical Hymenopteran Insects and Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2016.
- McDonald, I. R., Doronina, N. V., Trotsenko, Y. A., McAnulla, C., & Murrell, J. C. (2001). *Hyphomicrobium chloromethanicum* sp. nov. And *Methylobacterium chloromethanicum* sp. nov., chloromethane-utilising bacteria isolated from a polluted environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51.
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., ... Wernegreen, J. J. (2013a). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 3229–3236.
- McKay, G. A., Woods, D. E., MacDonald, K. L., & Poole, K. (2003). Role of Phosphoglucosyltransferase of *Stenotrophomonas maltophilia* in Lipopolysaccharide Biosynthesis, Virulence, and Antibiotic Resistance. *Infection and Immunity*, 71, 3068–3075.
- Medina, R. F., Nachappa, P., & Tamborindeguy, C. (2011). Differences in bacterial diversity of host-associated populations of *Phylloxera notabilis* Pergande (Hemiptera: Phylloxeridae) in pecan and water hickory. *Journal of Evolutionary Biology*, 24, 761–771.

Mereghetti, V., Chouaia, B., & Montagna, M. (2017). New Insights into the Microbiota of Moth Pests. *International Journal of Molecular Sciences*, 1 - 24.

Meriweather, M., Matthews, S., Rio, R., & Baucom, R. S. (2013). A 454 Survey Reveals the Community Composition and Core Microbiome of the Common Bed Bug (*Cimex lectularius*) across an Urban Landscape. *PLoS ONE*, 8, e61465.

Mesquita-Braga, R., Nóbrega-Dourado, M., & Luiz-Araújo, W. (2016). Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY*, 86-98.

Miao, V., & Davies, J. (2010). Actinobacteria: The good, the bad, and the ugly. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98, 143–150.

Mogouong, J., Constant, P., Lavallée, R., & Guertin, C. (2020). Gut microbiome of the emerald ash borer, *Agilus planipennis* Fairmaire, and its relationship with insect population density. *FEMS Microbiology Ecology*, 1 - 12.

Mohammed, W. S., Ziganshina, E. E., Shagimardanova, E. I., Gogoleva, N. E., & Ziganshin, A. M. (2018). Comparison of intestinal bacterial and fungal communities across various xylophagous beetle larvae (Coleoptera: Cerambycidae). *Scientific Reports*, 1 - 12.

Mohanta, D., Ghangal, R., Solanki, M., & Patnaik, S. (2020). Delivery of microbial metabolites for human health care: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 18, 595–603.

Momeni, B., Chen, C.-C., Hillesland, K., Waite, A., & Shou, W. (2011). Using artificial systems to explore the ecology and evolution of symbioses. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 68, 1353–1368.

Moore, E. R. B., Krüger, A. S., Hauben, L., Seal, S. E., De Baere, R., De Wachter, R., ... Swings, J. (1997). 16S rRNA gene sequence analyses and inter- and intrageneric relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters*, 151, 145–153.

Moraes, A. P. R., Videira, S. S., Bittencourt, V. R. E. P., & Bittencourt, A. J. (2014). Antifungal activity of *Stenotrophomonas maltophilia* in *Stomoxys calcitrans* larvae. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23, 194–199.

Morales-Jiménez, J., Zúñiga, G., Ramírez-Saad, H., & Hernández-Rodríguez, C. (2012). Gut-Associated Bacteria Throughout the Life Cycle of the Bark Beetle *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and Bright (Curculionidae: Scolytinae) and Their Cellulolytic Activities. *Microbial Ecology*, 64, 268–278.

Morales-Jiménez, J., Zúñiga, G., Villa-Tanaca, L., & Hernández-Rodríguez, C. (2009). Bacterial Community and Nitrogen Fixation in the Red Turpentine Beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Microbial Ecology*, 58, 879–891.

Moran, N. A. (2006). Symbiosis. *Current biology*, 866-871.

Morin, P. J. (2011). *Community Ecology*. New Jersey: Wiley-Blackwell.

Muñoz-Benavent, M. E., Pérez-Cobas, A., García-Ferris, C., & Moya, A. (2021). Insects' potential: Understanding the functional role of their gut microbiome. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1-13.

Muratore, M., Prather, C., & Sun, Y. (2020). The gut bacterial communities across six grasshopper species from a coastal tallgrass prairie. *PLoS ONE*, 15, e0228406.

Murphy, R., Benndorf, R., Beer, Z. W., Vollmers, J., Kaster, A.-K., Beemelmans, C., & Poulsen, M. (2021). Comparative Genomics Reveals Prophylactic and Catabolic Capabilities of Actinobacteria within the Fungus-Farming Termite Symbiosis. *MSphere*, 1 - 12.

Nakashima, K., Watanabe, H., Saitoh, H., Tokuda, G., & Azuma, J.-I. (2002). Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 777–784.

Na-Ri, S., Tae-Woong, W., & Jin-Woo, B. (2015). Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, 496 - 583.

Newell, P. D., & Douglas, A. E. (2014). Interspecies Interactions Determine the Impact of the Gut Microbiota on Nutrient Allocation in *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology*.

Nishimura, Y., Shimadzu, M., & Iizuka, H. (1981). Bacteriochlorophyll formation in radiation-resistant *Pseudomonas radiora*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 27.

Niu, G., & Li, W. (2019). Next-Generation Drug Discovery to Combat Antimicrobial Resistance. *Trends in Biochemical Sciences*, 44, 961–972.

Noskov, Y. A., Kabilov, M. R., Polenogova, O. V., Yurchenko, Y. A., Belevich, O. E., Yaroslavtseva, O. N., ... Kryukov, V. Y. (2021). A Neurotoxic Insecticide Promotes Fungal Infection in *Aedes aegypti* Larvae by Altering the Bacterial Community. *Microbial Ecology*, 81, 493–505.

O' Brien, J., & Wright, G. D. (2011). An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 552 - 558.

Oguma, K., Kanazawa, K., Kasuga, I., & Takizawa, S. (2018). Effects of UV Irradiation by Light Emitting Diodes on Heterotrophic Bacteria in Tap Water. *Photochemistry and Photobiology*, 94, 570–576.

Ohike, T., Maeda, M., Matsukawa, T., Okanami, M., Kajiyama, S., & Ano, T. (2017). In vitro and in vivo Assay for Assessment of the Biological Control Potential of *Streptomyces* sp. *KT. Journal of Plant Studies*, 7, 10.

Oskay, M. (2009). Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *African Journal of Biotechnology*, 8, 3007–3017.

Ozsahin, E., Sezen, K., Demir, I., & Demirbag, Z. (2014). Bacterial isolates from *Palomena prasina* (Hemiptera: Pentatomidae) include potential microbial control agents. *Biocontrol Science and Technology*.

Pankratov, T. A., Dedysh, S. N., & Zavarzin, G. A. (2006). The leading role of actinobacteria in aerobic cellulose degradation in Sphagnum peat bogs. *Doklady Biological Sciences: Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological Sciences Sections*, 410, 428–430.

Papadopoulos, C., Karas, P. A., Vasileiadis, S., Ligda, P., Saratsis, A., Sotiraki, S., & Karpouzas, D. G. (2020). Host Species Determines the Composition of the Prokaryotic Microbiota in *Phlebotomus* Sandflies. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9, E428.

Park, S.-H., Moon, K., Bang, H.-S., Kim, S.-H., Kim, D.-G., Oh, K.-B., ... Oh, D.-C. (2012). Tripartilactam, a Cyclobutane-Bearing Tricyclic Lactam from a *Streptomyces* sp. In a Dung Beetle's Brood Ball. *Organic Letters*, 14, 1258–1261.

Patt, T. E., Cole, G. E., & Hanson, R. S. (1976). *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26.

Patt, T. E., Cole, G. E., Bland, J., & Hanson, R. S. (1974). Isolation and characterization of bacteria that grow on methane and organic compounds as sole sources of carbon and energy. *J. Bacteriol.*, 120.

Peel, D., & Quayle, J. R. (1961). Microbial growth on C1 compounds. 1: Isolation and characterisation of *Pseudomonas* AM1. *Biochem. J.*, 81.

Periyasamy, S., Devi, S. S., & Kathirvel, P. (2018). Spectroscopic studies, Antioxidant and Anticancer attributes of diffusible eumelanin produced by marine *Streptomyces rochei*. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*.

Peters, B., J.W., C., & Eldridge, R. (2002). 107 Australian Forestry Vlyctine (Coleoptera: Bostrichidae) pests of timber in Australia: A literature review and susceptibility testing protocol. *Australian Forestry*, 107 - 119.

Pham, J. V., Yilma, M. A., Feliz, A., Majid, M. T., Maffetone, N., Walker, J. R., ... Yoon, Y. J. (2019). A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. *Frontiers in Microbiology*, 10.

Podgwaite, J., D' Amico, V., Zerillo, R., & Schoenfeldt, H. (2013). Bacteria Associated with Larvae and Adults of the Asian Longhorned Beetle (Coleoptera: Cerambycidae) *Journal of Entomological Science*, 48, 128–138.

Popa, V., Déziel, E., Lavallée, R., Bauce, E., & Guertin, C. (2012). The complex symbiotic relationships of bark beetles with microorganisms: A potential practical approach for biological control in forestry. *Pest Management Science*, 68, 963–975.

Poulsen, M., & Sapountzis, P. (2012). Behind every great ant, there is a great gut. *Molecular Ecology*, 21, 2054–2057.

Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2002). *Microbiología*. Madrid: The MacGraw-Hill Companies, Inc.

Prudnikova, S., Streltsova, N., & Volova, T. (2021). The effect of the pesticide delivery method on the microbial community of field soil. *Environmental Science & Pollution Research*, 28, 8681–8697.

Qiu, L., Zhang, T.-S., Song, J.-Z., Zhang, J., Li, Z., & Wang, J.-J. (2021). BbWor1, a Regulator of Morphological Transition, Is Involved in Conidium-Hypha Switching, Blastospore Propagation, and Virulence in *Beauveria bassiana*. *Microbiology Spectrum*, 9, e00203-21.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, D590–D596.

Quayle, J. R. (1972). The metabolism of one-carbon compounds by microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.*, 7.

Quinn, G. A., Banat, A. M., Abdelhameed, A. M., & Banat, I. M. (2020). *Streptomyces* from traditional medicine: Sources of new innovations in antibiotic discovery. *Journal of Medical Microbiology*, 69, 1040–1048.

Raffa, K. f. (2014). Terpenes Tell Different Tales at Different Scales: Glimpses into the Chemical Ecology of Conifer - Bark Beetle - Microbial Interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 40, 1–20.

Raza, S., Riaz, A., & Rasib, K. Z. (2019). Synergistic Effect of Fungus *Metarhizium anisopliae* and Slow Acting Toxicants Fipronil and Imidacloprid against Subterranean Termites: Termites Control by Fungus and Toxicants. *Biological Sciences - PJSIR*, 62, 88–96.

Reid, N. M., Addison, S. L., Macdonald, L. J., & Lloyd-Jones, G. (2011). Biodiversity of active and inactive bacteria in the gut flora of wood-feeding huhu beetle larvae (*Prionoplus reticularis*). *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 7000–7006.

Rheims, H., & Stackebrandt, E. (1999). Application of nested polymerase chain reaction for the detection of yet uncultured organisms of the class Actinobacteria in environmental samples. *Environmental Microbiology*, 1, 137–143.

Ridley, E. V., Wong, A. C.-N., Westmiller, S., & Douglas, A. E. (2012). Impact of the Resident Microbiota on the Nutritional Phenotype of *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE*, 7, e36765.

Rodríguez Guerra, R., Armijo-Martínez, L., & López-Arroyo, J. I. (2020). Induction of conidia germination of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and the mycoparasite *Trichoderma harzianum*. *Nature research*, 5, 48.

Romero - Victorica, M., Soria, M. A., ALberto, B. -G., Ceja - Navarro, j. A., Vikram, S., Ortiz, M., . . . Etcheverry, C. (2020). Neotropical termite microbiomes as sources of novel plant cell wall degrading enzymes. *SCIENTIFIC REPORTS* 1 - 14.

Ruiu, L., Satta, A., & Floris, I. (2013). Emerging entomopathogenic bacteria for insect pest management. *Bulletin of Insectology*, 181 - 186.

Sabree, Z. L. (2014). Host-specific assemblages typify gut microbial communities of related insect species. *Springerplus*, 1-11.

Sachs, J. L., Mueller, U. G., Wilcox, T. P., & Bull, J. J. (2004). The evolution of cooperation. *The Quarterly Review of Biology*, 79, 135–160.

Sahu, K. P., Kumar, A., Patel, A., Kumar, M., Gopalakrishnan, S., Prakash, G., ... Gogoi, R. (2021). Rice Blast Lesions: An Unexplored Phyllosphere Microhabitat for Novel Antagonistic Bacterial Species Against *Magnaporthe oryzae*. *Microbial Ecology*, 81, 731–745.

Salcedo-Porras, N., Umaña-Díaz, C., de Oliveira Barbosa Bitencourt, R., & Lowenberger, C. (2020). The Role of Bacterial Symbionts in Triatomines: An Evolutionary Perspective. *Microorganisms*, 8, 1438.

Salem, H., & Kaltenpoth, M. (2022). Beetle–Bacterial Symbioses: Endless Forms Most Functional. *Annual Review of Entomology*, 67, 201–219.

Salem, H., Bauer, E., Strauss, A. S., Vogel, H., Marz, M., & Kaltenpoth, M. (2014). Vitamin supplementation by gut symbionts ensures metabolic homeostasis in an insect host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1 - 10.

Salem, H., Kreutzer, E., Sudakaran, S., & Kaltenpoth, M. (2013). Actinobacteria as essential symbionts in firebugs and cotton stainers (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Environmental Microbiology*, 15, 1956–1968.

Salverda, M., & Stouthamer, R. (2003). Integrative Studies of Wolbachia-Eukaryotic Interactions: Genomes to Communities and Back. *Frontiers in Integrative Biological Research*, 1.

Samarasinghe, H., Aceituno-Caicedo, D., Cogliati, M., Kwon-Chung, K. J., Rickerts, V., Velegraki, A., ... Xu, J. (2018). Genetic Factors and Genotype-Environment Interactions Contribute to Variation in Melanin Production in the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Scientific Reports*, 8, 9824.

Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 283 - 300.

Sánchez-López, A. S., Pintelon, I., Stevens, V., Imperato, V., Timmermans, J.-P., González-Chávez, C., ... Thijs, S. (2018b). Seed Endophyte Microbiome of *Crotalaria pumila* Unpeeled: Identification of Plant-Beneficial Methylobacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, E291.

Sansone, C. L., Cohen, J., Yasunaga, A., Xu, J., Osborn, G., Subramanian, H., ... Cherry, S. (2015). Microbiota-Dependent Priming of Antiviral Intestinal Immunity in *Drosophila*. *Cell Host & Microbe*, 18, 571–581.

Sapp, J. (2004). The dynamics of symbiosis: an historical overview. *Can. J. Bot*, 1036 - 1056.

Sato, K. (1978). Bacteriochlorophyll formation by facultative methylotrophs, *Protaminobacter ruber* and *Pseudomonas AM1*. *FEBS Lett*, 85.

Sato, K., & Shimizu, S. (1979). The conditions for bacteriochlorophyll formation and the ultrastructure of a methanol-utilizing bacterium, *Protaminobacter ruber*, classified as non-photosynthetic bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 43.

Sautour, M., Lemaître, J.-P., Ranjard, L., Truntzer, C., Basmaciyan, L., Depret, G., ... Dalle, F. (2021). Detection and survival of *Candida albicans* in soils. *Environmental ADN*, 3, 1093–1101.

Schloss, P. D., Delalibera, I., Handelsman, J., & Raffa, K. F. (2006). Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabri-pennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae). *Environmental Entomology*, 35, 625 - 629.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671-675.

Schütz, V., Frindte, K., Cui, J., Zhang, P., Hacquard, S., Schulze-Lefert, P., ... Dörmann, P. (2021). Differential Impact of Plant Secondary Metabolites on the Soil Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 12.

Scott, J. J., Oh, D.-C., Yuceer, M. C., Klepzig, K. D., Clardy, J., & Currie, C. R. (2008). Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *Science* (New York, N.Y.), 322, 63.

Scully, E. D., Geib, S. M., Carlson, J. E., Tien, M., McKenna, D., & Hoover, K. (2014). Functional genomics and microbiome profiling of the Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis*) reveal insights into the digestive physiology and nutritional ecology of wood feeding beetles. *BMC Genomics*, 15, 1096.

Scully, E. D., Geib, S. M., Hoover, K., Tien, M., & Tringe, S. G. (2013). Metagenomic Profiling Reveals Lignocellulose Degrading System in a Microbial Community Associated with a Wood-Feeding Beetle. *PLoS ONE*, 8, 1 - 22.

Scully, E. D., Geib, S. M., Hoover, K., Tien, M., Tringe, S. G., Barry, K. W., ... Carlson, J. E. (2013). Metagenomic Profiling Reveals Lignocellulose Degrading System in a Microbial Community Associated with a Wood-Feeding Beetle. *PLoS ONE*, 8, e73827.

Seipke, R. F., Barke, J., Heavens, D., Yu, D. W., & Hutchings, M. I. (2013). Analysis of the bacterial communities associated with two ant-plant symbioses. *MicrobiologyOpen*, 2, 276–283.

Seo, S. N., Lee, J. H., & Kim, Y. M. (2007). Characterization of an iron- and manganese-containing superoxide dismutase from *Methylobacillus* sp. Strain SK1 DSM 8269. *Molecules and Cells*, 23, 370–378.

Sezen, K., Muratoğlu, H., Nalcacioglu, R., Mert, D., Demirbag, Z., & Kati, H. (2008). Highly pathogenic *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* from European shot-hole borer, *Xyleborus dispar* (Coleoptera: Scolytidae). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 77 - 84.

Shalayel, M., Nour, S., Al-Mazaideh, G., Sabry, Y., Mahmoud, S., & Farrag, E. (2021). Antifungal efficacy of clove flower buds (*Syzygium aromaticum*) oil and aqueous extract against dermatophytes clinical isolates. *Medical Science*, 25, 744–750.

Shi, W., Xie, S., Chen, X., Sun, S., Zhou, X., Liu, L., ... Yuan, J. S. (2013). Comparative Genomic Analysis of the Endosymbionts of Herbivorous Insects Reveals Eco-Environmental Adaptations: Biotechnology Applications. *PLoS Genetics*, 9, 1 - 12.

Silva, L. J., Crevelin, E. J., Souza, D. T., Lacerda-Júnior, G. V., de Oliveira, V. M., Ruiz, A. L. T. G., ... Melo, I. S. (2020). Actinobacteria from Antarctica as a source for anticancer discovery. *Scientific Reports*, 10, 13870.

Sipriyadi, Darwis, W., Wibowo, R. H., & Farestiani, E. (2020). Characterization and Identification of Xylanolytic Bacteria *Stenotrophomonas* sp. EL-8 Isolated from Seagrass Substrates in Enggano Island. IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 457, 012068.

Six, D. L. (2013). The Bark Beetle Holobiont: Why Microbes Matter. *Microbial Chemical Ecology*, 39, 989–1002.

Six, D. L., & Wingfield, M. J. (2011). The Role of Phytopathogenicity in Bark Beetle–Fungus Symbioses: A Challenge to the Classic Paradigm. *Annu. Rev. Entomol.*, 255 - 272.

Skowronek, M., Sajnaga, E., Pleszczyńska, M., Kazimierzak, W., Lis, M., & Wiater, A. (2020). Bacteria from the Midgut of Common Cockchafer (*Melolontha melolontha* L.) Larvae Exhibiting Antagonistic Activity Against Bacterial Symbionts of Entomopathogenic Nematodes: Isolation and Molecular Identification. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 580.

Sloan Wilson, D. (2017). Biological communities as functionally organized units. *Ecological Society of America*, 2018 - 2024.

Souza, F., Silva, V., & Bitencourt, T. (2020). Use of McFarland Standards and Spectrophotometry for *Yarrowia lipolytica* QU69 cell counting. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 5, 1089–1091.

Sripreechusak, P., Suwanborirux, K., & Tanasupawat, S. (2014). Characterization and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains from soils in southern Thailand. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 24 - 31.

Stepniewska, Z., & Kuźniar, A. (2013). Endophytic microorganisms—Promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 9589–9596.

Stilling, R., Dinan, T., & Cryan, J. (2013). Microbial Genes, Brain & Behaviour—Epigenetic Regulation of the Gut-Brain Axis. *Genes, Brain, and Behavior*, 13.

Stirling, D. I., & Dalton, H. (1985). In A. T. Bull & H. Dalton (Eds.), *Aerobic metabolism of methane and methanol*. Oxford: Pergamon.

Stocks, P. K., & McCleskey, C. S. (1964). Identity of the pink-pigmented methanol-oxidising bacteria as *Vibrio extorquens*. *J. Bacteriol.*, 88.

Sun, J.-Z., & Scharf, M. E. (2010). Exploring and integrating cellulolytic systems of insects to advance biofuel technology. *Insect Science*, 17, 163–165.

Takasuka, T. E., Book, A. J., Lewin, G. R., Currie, C. R., & Fox, B. G. (2013). Aerobic deconstruction of cellulosic biomass by an insect-associated *Streptomyces*. *Scientific Reports*, 3, 1030.

Téfit, M. A., & Leulier, F. (2017). *Lactobacillus plantarum* favors the early emergence of fit and fertile adult *Drosophila* upon chronic undernutrition. *Journal of Experimental Biology*, 220, 900–907.

Thomma, B. P. H. J. (2003). *Alternaria* spp.: From general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4, 225–236.

Toghueo, R. M. K., & Boyom, F. F. (2020). Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. *Biotech*, 10, 107.

Tozlu, E., Tozlu, G., Kotan, R., Çalmaşur, Ö., & Dadaşoğlu, F. (n.d.). Investigation of some entomopathogens as biocontrol agents of *Tinocallis* (*Sappocallis*) saltans (Nevsky, 1929) (Hemiptera: Aphididae). *Turk J Agric For*, 9.

Trizna, E., Baidamshina, D., Mironova, A., & Kayumov, A. (2020). The mutual alteration of bacterial susceptibility to antimicrobials in dual-species biofilm. 4, 989–990.

Tsuji, K., Tsien, H. C., Hanson, R. S., Palma, S. R., Scholtz, R., & Roche, S. (1990). 16S ribosomal RNA sequence analysis for determination of phylogenetic relationship among methylotrophs. *J. Gen. Microbiol.*, 136.

- Turbek, S. P., Chock, T. M., Donahue, K., Havrilla, C. A., Oliverio, A. M., Polutchko, S. K., ... Vimercati, L. (2016). Scientific Writing Made Easy: A Step-by-Step Guide to Undergraduate Writing in the Biological Sciences. *The Bulletin of the Ecological Society of America*, 97, 417–426.
- Turnau, K., Fiałkowska, E., Ważny, R., Rozpądek, P., Tylko, G., Bloch, S., ... Węgrzyn, G. (2021). Extraordinary Multi-Organismal Interactions Involving Bacteriophages, Bacteria, Fungi, and Rotifers: Quadruple Microbial Trophic Network in Water Droplets. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 2178.
- Ulyshen, M. D. (2016). Wood decomposition as influenced by invertebrates. *Biological Reviews*, 91, 70–85.
- Urakami, T., & Komagata, K. (1979). Cellular fatty acid composition and coenzyme Q System in Gram-negative methanol-utilizing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 25.
- Urakami, T., & Komagata, K. (1981). Electrophoretic comparison of enzymes in Gram-negative methanol-utilizing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 27.
- Urakami, T., & Komagata, K. (1984). Protomonas, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34.
- Urakami, T., & Komagata, K. (1986). Occurrence of isoprenoid compounds in Gram-negative methanol, methane and methylamine utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 32.
- Urakami, T., & Komagata, K. (1987). Cellular fatty acid composition with special reference to the existence of hydroxy fatty acids in Gram-negative methanol, methane and methylamine utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 33.
- Urakami, T., Araki, H., Suzuki, K.-I., & Komagata, K. (1993). Further studies of the genus *Methylobacterium* and description of *Methylobacterium aminovorans* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43.
- Uribe Londoño, M., Romero-Tabarez, M., Ortiz-Reyes, A., Uribe Londoño, M., Romero-Tabarez, M., & Ortiz-Reyes, A. (2019). Bacterial extracts for the control of *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Agaricaceae). *Revista de Biología Tropical*, 67, 1010–1022.
- van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., & van Wezel, G. P. (2020a). Ecology and genomics of Actinobacteria: New concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 546–558.
- Van Moll, L., De Smet, J., Cos, P., & Van Campenhout, L. (2021). Microbial symbionts of insects as a source of new antimicrobials: a review. *CRITICAL REVIEWS IN MICROBIOLOGY*, 562 - 579.
- Vanbergen, A. J., Woodcock, B. A., Gray, A., Grant, F., Telford, A., Lambdon, P., . . . Cavers, S. (2014). Grazing alters insect visitation networks and plant mating systems. *Functional Ecology*, 178 - 189.
- Vasanthabharathi, V., Lakshminarayanan, R., & Jayalakshmi, S. (2011). Melanin production from marine Streptomyces. *African Journal of Biotechnology*, 10, 11224–11234.
- Visser, A. A., Nobre, T., Currie, C. R., Aanen, D. K., & Poulsen, M. (2012). Exploring the potential for actinobacteria as defensive symbionts in fungus-growing termites. *Microbial Ecology*, 63, 975–985.
- Viswam, J., Lee, C., Morgan, H., & McDonald, I. (2018). Laboratory rearing of huhu, *Prionoplus reticularis* (Cerambycidae): Insights into the gut microbiome. *New Zealand Journal of Zoology*, 46, 1–12.
- Vivero, R. J., Villegas-Plazas, M., Cadavid-Restrepo, G. E., Herrera, C. X. M., Uribe, S. I., & Junca, H. (2019). Wild specimens of sand fly phlebotomine *Lutzomyia evansi*, vector of leishmaniasis, show high abundance of *Methylobacterium* and natural carriage of *Wolbachia* and *Cardinium* types in the midgut microbiome. *Scientific Reports*, 9, 17746.
- Vries, J. T., & Derx, H. G. (1953). On the occurrence of *Mycoplasma rubra* and its identity with *Protaminobacter ruber*. *Ann. Bogoriensis*, 1.

Wang, M., Xiang, X., & Wan, X. (2020). Divergence in Gut Bacterial Community Among Life Stages of the Rainbow Stag Beetle *Phalacrognathus muelleri* (Coleoptera: Lucanidae). *Insects*, 11, 719.

Wang, Y., Stata, M., Wang, W., Stajich, J. E., White, M. M., & Moncalvo, J.-M. (2018). Comparative Genomics Reveals the Core Gene Toolbox for the Fungus-Insect Symbiosis. *MBio*, 9, e00636-18.

Watanabe, H., & Tokuda, G. (2010). Cellulolytic Systems in Insect. *ANNUAL REVIEWS*, 1 - 27.

Wen-Ru Li, Qing-Shan Shi, You-Sheng Ouyang, Yi-Ben Chen, & Shun-Shan Duan. (2013). Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7483–7492.

Wernegreen, J. (2015). Endosymbiont evolution: predictions from theory and surprises from genomes. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES*, 16-35.

West, S. A., Diggle, S. P., Buckling, A., Gardner, A., & Griffin, A. S. (2007). The Social Lives of Microbes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38, 53–77.

Wølfrum, T., Gruner, G., & Stolp, H. (1986). Nucleic acid hybridization of pink-pigmented facultative methylotrophs and pseudomonads. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36.

Wong, A. C.-N., Dobson, A. J., & Douglas, A. E. (2014). Gut microbiota dictates the metabolic response of *Drosophila* to diet. *Journal of Experimental Biology*, jeb.101725.

Wood, A. P., Kelly, D. P., McDonald, I. R., Jordan, S. L., Morgan, T. D., Khan, S., ... Borodina, E. (1998). A novel, pink-pigmented facultative methylotroph, *Methylobacterium thiocyanatum* sp. Nov., capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources. *Arch. Microbiol.*, 169.

Yoshimura, F. (1982). Phylloplane bacteria in a pine forest. *Can. J. Microbiol.*, 28.

Yu, F.-M., Jayawardena, R. S., Thongklang, N., Lv, M.-L., Zhu, X.-T., & Zhao, Q. (2022). Morel Production Associated with Soil Nitrogen-Fixing and Nitrifying Microorganisms. *Journal of Fungi*, 8, 299.

Yu, H., Wang, Z., Liu, L., Xia, Y., Cao, Y., & Yin, Y. (2008). Analysis of the intestinal microflora in *Hepialus gonggaensis* larvae using 16S rRNA sequences. *Current Microbiology*, 391 - 396.

Yun, J.-H., Roh, S. W., Whon, T. W., Jung, M.-J., Kim, M.-S., Park, D.-S., ... Bae, J.-W. (2014). Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5254–5264.

Zhang, F., Zhao, M., Braun, D. R., Ericksen, S. S., Piotrowski, J. S., Nelson, J., ... Audhya, A. (2020). A marine microbiome antifungal targets urgent-threat drug-resistant fungi. *Science*, 370, 974–978.

Zhang, Z., Jiao, S., Li, X., & Li, M. (2018). Bacterial and fungal gut communities of *Agrilus mali* at different developmental stages and fed different diets. *Scientific Reports*, 8, 15634.

Zhou, L.-F., Wu, J., Li, S., Li, Q., Jin, L.-P., Yin, C.-P., & Zhang, Y.-L. (2021). Antibacterial Potential of Termite-Associated *Streptomyces* spp. *ACS Omega*, 6, 4329–4334.

Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 723–735.

Zimorski, V., Ku, C., Martin, W. F., & Gould, S. B. (2014). Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current Opinion in Microbiology*, 22, 38–48.